

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Andreas Erbersdobler

**Expressions- und Mutationsanalysen bei humanen chromophoben
Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Stephanie Wilken, geb. am 22.12.1987 in Rostock

aus Amelinghausen

Rostock, 25.01.2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002735

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler, UMR Rostock, Institut für Pathologie
2. Prof. Dr. med. habil. O. Hakenberg, UMR Rostock, Urologische Klinik und Poliklinik
3. Prof. Dr. med. G. Sauter, UKE Hamburg, Institut für Pathologie

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2019

Für meine geliebte Mutti.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	4
II	Abbildungsverzeichnis.....	6
III	Tabellenverzeichnis.....	7
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	8
1.	Einleitung.....	11
1.1	Epitheliale Neoplasien der humanen Niere.....	11
1.1.1	Das Nierenzellkarzinom.....	11
1.1.2	Das chromophobe Nierenzellkarzinom.....	15
1.1.3	Das renale Onkozytom.....	17
1.2	Rezeptortyrosinkinase KIT.....	19
1.3	Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) und mTOR-Inhibitoren in der Therapie von humanen Nierenzellkarzinomen.....	21
1.4	Fragestellung und Ziele.....	24
2.	Material und Methoden.....	26
2.1	Material.....	26
2.2	Studiendesign.....	28
2.3	Tissue Microarray (TMA).....	29
2.4	Immunhistochemie.....	31
2.5	c-kit-Mutationsanalyse.....	31
2.6	Statistische Auswertung.....	35
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	Studienpopulation.....	36
3.2	Histochemische und immunhistochemische Analyse.....	40
3.3	c-Kit-Mutationsanalyse.....	44

4.	Diskussion.....	46
4.1	Studienpopulation.....	46
4.2	Epidemiologie der TNM-Klassifikation.....	47
4.3	c-Kit-Expression und histologische Graduierung nach Fuhrman.....	48
4.4	Mutationsanalyse.....	50
4.5	c-Kit-Expression und Tyrosinkinase-Inhibitoren beim humanen Nierenzellkarzinom.....	50
5.	Zusammenfassung.....	52
V	Literaturverzeichnis.....	53
VI	Publikation der Daten dieser Arbeit.....	59
VII	Lebenslauf.....	60
VIII	Danksagung.....	63
IX	Erklärung über die selbstständige Abfassung einer medizinischen Dissertation.....	65
X	Thesen.....	66

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Empfehlung für therapeutische Strategien bei der Behandlung des humanen Nierenzellkarzinoms.	14
Abbildung 2: Signaltransduktionskaskade der Rezeptortyrosinkinase KIT.	20
Abbildung 3: Empfehlung für medikamentöse Erst- und Zweitlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms.	24
Abbildung 4: Repräsentative H&E-Färbung eines TMA von klarzelligen Nierenzellkarzinomen.	40
Abbildung 5: Repräsentative histochemische H&E-Färbung verschiedener, in der vorliegenden Studie analysierten Nierenzelltumoren.	41
Abbildung 6: Repräsentativer immunhistochemischer Nachweis von CD 117 (c-kit) in nicht pathologischem Nierengewebe, chromophoben Nierenzellkarzinom und renalem Onkozytom.	43
Abbildung 7: Box und Whisker-Graphik des c-kit-Scores von nicht pathologischem Nierengewebe und pathologischem Nierengewebe (chromophobe Nierenzellkarzinome und Onkozytome).	44

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikationssysteme der humanen Nierenzellkarzinome	12
Tabelle 2:	Verwendete Materialien und Herstellerangaben	26
Tabelle 3:	Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach TNM	28
Tabelle 4:	Ergebnisse nach H&E-Färbung.....	30
Tabelle 5:	Kriterien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von entarteten Zellen nach Fuhrman	30
Tabelle 6:	Primersequenzen, die für die Genamplifikation und Sequenzierung der Exons 9, 11, 13, 14, 15 und 17 des c-Kit-Gens verwendet wurden.	33
Tabelle 7:	Absolute und prozentuale Häufigkeiten der in die Studie eingeschlossenen Patienten hinsichtlich ihres Geschlechtes und Tumorentität.....	36
Tabelle 8:	Absolute Häufigkeiten der TNM-Klassifikation der analysierten Nierenzellkarzinome der Studienpopulation	38
Tabelle 9:	c-kit-Expression und Gesamt-c-kit-Score bei verschiedenen Entitäten der Nierentumoren.....	42
Tabelle 10:	Ergebnisse der c-kit-Mutationsanalyse und des kit-Scores von 2 Onkozytomen und 21 chromophoben Nierenzellkarzinomen	45

IV Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
BCR-abl	Fusionsprotein / Onkoprotein
BHDS	Birt-Hogg-Dubé-Syndrom
CA-IX	Carboanhydrase IX
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom (englisch: Clearcell Renal Carcinoma)
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (englisch: Cluster Of Differentiation)
CD10	Atriopeptidase
CD117	Tyrosinkinase KIT; Synonym: Zytokinrezeptor des Stammzellfaktors, Stammzellfaktor-Rezeptor, c-Kit
CD44	Hyaluron-Rezeptor mit seinen Isoformen
chRCC	chromophobes Nierenzellkarzinom
CK	Zytokeratin
c-Kit (KIT)	Tyrosinkinase; Synonym: Zytokinrezeptor des Stammzellfaktors, Stammzellfaktor-Rezeptor, CD117
<i>c-kit</i>	Protoonkogen
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: Desoxyribonucleic Acid)
EGFR	EGF-Rezeptor (englisch: Epidermal Growth Factor Receptor); Synonym: ErbB1, HER1
EMA	Epitheliales Membranantigen (englisch: Epithelial Membrane Antigen)
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (englisch: Fibroblast Growth Factor Receptor)
FLCN	Folliculin-Gen
Flt-3	Rezeptortyrosinkinase (englisch: Fms-Like Tyrosine Kinase 3); Synonym: CD135
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
H&E	Hämatoxylin&Eosin

IFN-Alpha	Interferon-Alpha
IL-2	Interleukin-2
JAK2	Januskinase-2
M	Fernmetastasierung (englisch: Metastasis)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mib1	Proliferationsmarker; Synonym: Ki-67
mTOR	Bindungspartner von Rapamycin (englisch: Mammalian Target Of Rapamycin)
N	regionärer Lymphknotenstatus (englisch: Node)
OS	medianes Gesamtüberleben (englisch: Overall Survival)
p	p-Wert; Synonym: Signifikanzwert, Wahrscheinlichkeit
PAX2	Gen-Symbol (englisch: Paired Box 2)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction)
PDGF-R	Plättchen-Wachstumsfaktor Rezeptor (englisch: Platelet-Derived-Growth-Factor Receptor)
PFS	Progressionsfreies Überleben (englisch: Progressionfree Survival)
PNRA	Glykoprotein (englisch: Proximal Nephrogenic Renal Antigen); Synonym: gp200
pTNM	pathologische Klassifikation, postoperative histopathologische Klassifikation der TNM-Formel
R	Resektionsstatus
Raf1	Proteinkinase (englisch: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma); Synonym: c-Raf
RCC	Nierenzellkarzinom (englisch: Renal Cell Carcinoma)
RO	Renales Onkozytom
SCF	Stammzellfaktor (englisch: Stem Cell Factor)
Src	Tyrosinkinase (Akronym aus englischem Cellular und Sarcoma); Synonym: c-Src
T	Tumorgröße oder -ausbreitung
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMA	Gewebemikroarray (englisch: Tissue Micro Array)
VEGF-A	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor A (englisch: Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF-R	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor (englisch Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)
VHL	Von-Hippel-Lindau-Gen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)

1. Einleitung

1.1 Epitheliale Neoplasien der humanen Niere

1.1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom stellt etwa 3% aller malignen Tumorerkrankungen und 80% aller malignen Nierentumoren des Menschen dar (Siegel et al., 2015). Seine Inzidenz weist geographische, ethnische und altersspezifische Unterschiede auf und nimmt weltweit zu (Macleod et al., 2013). In Deutschland werden jährlich etwa 10.000 Neuerkrankungen registriert (Kaatsch et al., 2013). Im Vergleich dazu wurden in den USA für 2015 61.560 neue Fälle beschrieben. Die altersbezogene Inzidenz der Erkrankung steigt ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich an und erreicht ihren Höhepunkt in der 6. Lebensdekade (Siegel et al., 2015). Dabei erkranken Männer 1,5 – 3-mal häufiger als Frauen (Kaatsch et al., 2013; Kates et al., 2013).

Histologisch handelt es sich bei den humanen Nierenzellkarzinomen um heterogene Tumorentitäten. Die derzeit anerkannten Klassifikationssysteme (Klassifikation nach WHO, Klassifikation nach Thoenes et al., u.a.) differenzieren die Subtypen nach unterschiedlichen histologischen, zytologischen oder zytogenetischen Merkmalen. Trotz inhaltlicher Überschneidungen lassen sich diese nicht mühelos ineinander überführen (siehe Tabelle 1).

Während das klarzellige (70-80%) und das papilläre (10-15%) Nierenzellkarzinom dem proximalen Tubulusepithel entstammen, leiten sich das chromophobe (5%) Nierenzellkarzinom und das Ductus-Bellini-Karzinom (<1%) vom distalen Tubulus- bzw. Sammelrohrsystem her (Ng et al., 2014). Bei den spindelzelligen (sarkomatoiden) Formen handelt es sich um stark entdifferenzierte Varianten der Nierenzellkarzinom-Grundtypen.

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Als nachgewiesene Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms gelten das Rauchen, Übergewicht, chronische Niereninsuffizienz sowie erhöhter Blutdruck. Weitere mögliche auslösende Faktoren, wie z.B. Diabetes mellitus und virale Hepatitiden, sind in der Literatur beschrieben (Macleod et al., 2013). Tumorzytogenetisch werden chromosomale Aberrationen beschrieben. Bei der Mehrzahl (75%) der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigt sich ein Fragmentverlust am Chromosom 3 in Form von Mutationen des von Hippel-Lindau (VHL) Gens.

Tabelle 1: Klassifikationssysteme der humanen Nierenzellkarzinome (abgeleitet von Brinkmann et al., 2001)

2016 WHO-Klassifikation der epithelialen Nierenzelltumoren nach Moch [2016]		
Klarzelliges Nierenzellkarzinom		
Multilokuläre zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial		
Papilläres Nierenzellkarzinom		
Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom		
Chromophobes Nierenzellkarzinom		
Sammelrohrkarzinom		
Medulläres Karzinom der Niere		
MiT-Familie der Translokationskarzinome		
Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom		
Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom		
Erworbene Zystennieren-assoziiertes Nierenzellkarzinom		
Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom		
Nierenkarzinom, nicht klassifiziert		
Papilläres Adenom		
Onkozytom		
Klassifikation des Nierenzellkarzinomes nach Thoenes et al. und deren Häufigkeiten [1986]		
Typ des Nierenzellkarzinoms	Häufigkeit	
Klarzelliges	76%	
Chromophiles	10%	
Chromophobes	5%	
Duct-Bellini-Karzinom	1%	
Spindelzelliges	1%	
Onkozytom	5%	
Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach Kovacs sowie deren Modifikation von Weiss et al. auf der Basis zytogenetischer Veränderungen		
Typ des Nierenzellkarzinoms	Häufigkeit	Genetik
Nicht-papilläres Nierenzellkarzinom	80%	-3p, +5q/+5, -14q, -Y, -8p, +7, -6q, -9, +12
Papilläres Nierenzellkarzinom	14%	-Y, +7, +17; entdifferenziert: +16, +12, +20
Chromophobes Nierenzellkarzinom	4%	LOH 3p, 5q, 17p und 17q
Sammelrohrkarzinom	1%	unklar
Neuroendokrine Nierentumoren	<1%	unklar
Onkozytom	2%	unklar
Sarkomatoide Läsionen		entdifferenzierte Varianten
Heidelberg-Klassifikation von Nierentumoren nach Kovacs et al. [1997]		
Typ des Nierenzellkarzinoms	Häufigkeit	Genetik
Benigne Nierentumoren:		
Metanephroides Adenom / metanephroides Adenofibrom	selten	unklar
Papilläres Nierenzelladenom	sehr häufig	+7, +17, -Y
Renales Onkozytom	3-5%	-1p, -14q, -Y oder 11q13-Translokation
Maligne Nierentumoren:		
Gemeines oder konventionelles Nierenzellkarzinom	75%	-3p, Duplikatur 5q22, -6q, -8p, -9p und -14q
Papilläres Nierenzellkarzinom (vormals chromophil)	10%	Trisomie 3q, 7, 8, 12, 16, 17 und 20, -Y
Chromophobes Nierenzellkarzinom	5%	LOH 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 20
Sammelrohrkarzinom	1%	
Nicht-klassifizierbares Nierenzellkarzinom	3-5%	
Sarkomatoides Nierenzellkarzinom		Entdifferenzierte Varianten der o.g. Typen

Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach der Konsensuskonferenz der UICC und der AJCC nach Störkel et al. [1997]

Typ des Nierenzellkarzinoms	Häufigkeit	Genetik
Konventionelles	ca. 70%	3p-Verlust, in 5% sarkomatöse Differenzierung
Papilläres	10-15%	Trisomien (3q, 7, 12, 16, 17 und 20), -Y
Chromophobes	ca. 5%	Monosomien (1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21)
Sammelrohrkarzinom	<1%	nicht gesichert
Nicht-klassifiziertes	bis zu 5%	Sarkomatoide Tumoren ohne differenzierte Anteile

Etablierte, international anerkannte Prognosefaktoren für das Nierenzellkarzinom sind das Tumorstadium, das Tumorgrading und der histologische Typ (Haferkamp et al., 2006). Hinsichtlich des Tumorgradings ist darauf hinzuweisen, dass bisher keine allgemeingültige Grading-Methode existierte. International anerkannt und am meisten verwendet wurde bisher das nukleäre Grading nach Fuhrman von 1982 (Fuhrman et al., 1982), welches einer objektiven Graduierung der Nierenzellkarzinome dient. Aufgrund von Problemen mit der Interpretation, Validierung sowie Reproduzierbarkeit wird aktuell von der WHO empfohlen das vierstufige Graduierungssystem der International Society of Urological Pathology (ISUP) zu verwenden, welches sich bei klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen bewährt hat (Delahunt et al., 2013).

Ungefähr 70% der Nierentumoren werden zufällig im Rahmen von bildgebenden Untersuchungen (Sonographie, Computertomographie, usw.) diagnostiziert. Durch das zunächst lokal verdrängende Wachstum bleiben die Betroffenen lange asymptomatisch. Die klassische Symptom-Trias aus Hämaturie, Flankenschmerz und tastbarem Tumor ist durch die frühe Detektion selten geworden. Wie bei den meisten Tumorerkrankungen können Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Fieber und Gewichtsverlust (Stauffer-Syndrom) auftreten. Weiterhin werden in seltenen Fällen auch paraneoplastische Syndrome (durch Tumorzellen gebildete Hormone wie etwa Renin, Erythropoetin, Parathormon oder ACTH) beschrieben (Qi et al., 2014).

Die Therapieoptionen bei humanen Nierenzellkarzinomen beinhalten sowohl die chirurgische Resektion des Tumors als auch eine Systemtherapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren (siehe Abschnitt 1.3).

Der therapeutische Goldstandard bei den T1/T2 diagnostizierten nicht metastasierten Nierenzelltumoren ist die chirurgische Entfernung in Form einer partiellen oder radikalen Nephrektomie oder die nierenfunktionserhaltende Tumorexzision (Haferkamp et al., 2006).

Dies stellt den einzig möglichen kurativen Therapieansatz dar mit den besten Heilungschancen und exzellenten Langzeitergebnissen (Ng et al., 2014).

Eine effektive adjuvante Therapie des Nierenzellkarzinoms ist derzeit nicht verfügbar, da es unsensibel für konventionelle Chemotherapeutika (Haferkamp et al., 2006) und Strahlentherapie ist (Pomer et al., 1998; Krüger et al., 2012). Neue therapeutische Ansätze aufgrund molekulargenetischer Eigenschaften der fortgeschrittenen bzw. metastasierten Nierenzellkarzinome sind die kombinierte Behandlung mit Immunmodulatoren wie z.B. Zytokinen (Interferon alpha, IL-2) oder eine Target-Therapie mit z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) und mTOR-Inhibitoren (Jonasch et al., 2014). Solche systemischen Therapieansätze sind v.a. in folgenden Fällen indiziert: fortgeschrittenes RCC, metastasiertes RCC oder Irresektabilität (siehe Abbildung 1).

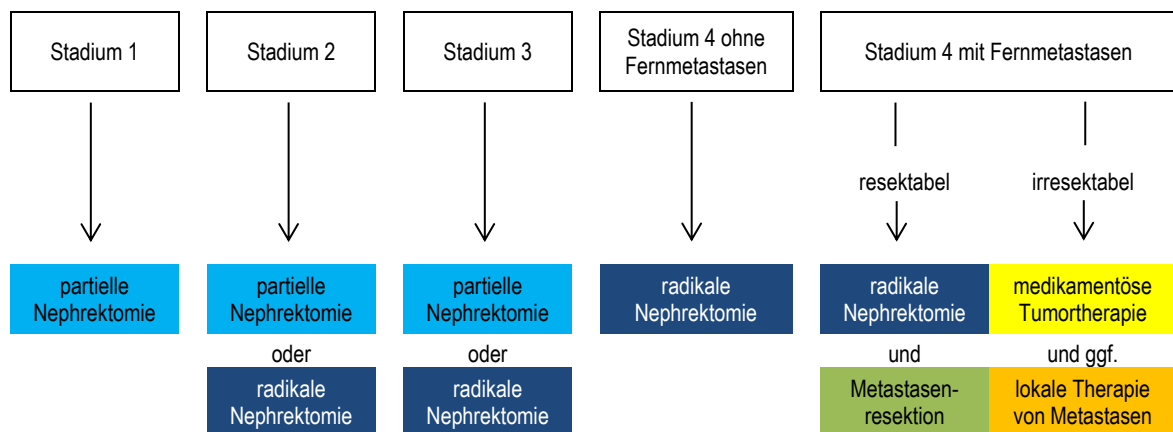


Abbildung 1: Empfehlung für die therapeutische Primärstrategien bei der Behandlung des humanen Nierenzellkarzinoms. Der Einsatz der verschiedenen therapeutischen Optionen richtet sich dabei nach dem Tumorstadium bei Erstdiagnose. Modifiziert nach Onkopedia.de

Zwischen histologischem Zelltyp und Prognose bestehen insofern gewisse Beziehungen, als das klarzellige Nierenzellkarzinome häufig früher metastasieren und eine höhere Letalität aufweisen als chromophobe Nierenzellkarzinome (Brkovic et al., 2001). Der wichtigste, das Überleben limitierende Faktor beim Nierenzellkarzinom, ist das Vorliegen einer Fernmetastasierung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen in etwa 30% der Nierenzellkarzinome bereits Metastasen in anderen Organen vor (v.a. pulmonal, lymphonodulär, hepatisch, ossär, adrenal, kontralateral renal oder cerebral). Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 93 % (Kanayama et al., 2015) bzw. 84 % (Stec et al., 2009) weist das chromophobe Nierenzellkarzinom eine sehr gute Prognose auf (Ng et al., 2014).

Im weiteren Verlauf entwickelt ungefähr ein Drittel der Patienten ohne primäre Metastasierung trotz erfolgter Nephrektomie Fernmetastasen (Godley et al., 2001). Dabei können zwischen Diagnosestellung, chirurgischer Therapie und Metastasendetektion Latenzzeiten von bis zu 10 Jahren und mehr auftreten, in denen der Patient klinisch unauffällig erscheinen kann (Pomer et al., 1998). Obwohl für die nicht metastasierten Nierenzellkarzinome weiterhin Tumorstadium, -grading und -subtyp wichtige Prognosefaktoren bleiben, wurden auf Grund des relativ variablen tumorbiologischen Verhaltens des Nierenzellkarzinoms in den vergangenen Jahren erhebliche Anstrengungen zur Definition weiterer möglicher prognostischer Marker unternommen (Takahashi et al., 2001).

1.1.2 Das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC)

Das chromophobzellige Nierenzellkarzinom macht etwa einen Anteil von 5% der humanen Nierenzellkarzinome aus (Stec et al., 2009) und wurde erstmals im Jahre 1985 von Thoenes et al. (Thoenes et al., 1986) beschrieben. Es zeigt von allen Entitäten des Nierenzellkarzinoms die beste Prognose und wird häufig in weniger fortgeschrittenen Stadien (I und II) diagnostiziert (Klatte et al., 2008). Zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt die mittlere Größe des chromophoben Nierenzellkarzinoms durchschnittlich 6 cm und ist in 10 bis 12 % der Fälle multifokal lokalisiert. Somit ist das chRCC bei Erstdiagnose größer als die anderen Entitäten der Nierenzellkarzinome. Dabei zeigt das chRCC eine geringere Tendenz zur Metastasierung (Klatte et al., 2008). Es sind jedoch auch seltene Fälle eines metastasierten chromophoben Nierenzellkarzinoms in der Literatur beschrieben (v.a. in der Leber), (Klatte et al., 2008). Das chromophobe Nierenzellkarzinom wird am häufigsten bei Patienten in der sechsten Lebensdekade diagnostiziert. Dabei weist die Inzidenz keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern auf. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Histogenetisch entstammt das chRCC dem distalen Tubulusepithel und/oder den kortikalen Anteilen des Sammelrohrsystems.

Die chromophoben Nierenzellkarzinome erscheinen makroskopisch als scharf begrenzte Tumoren mit leicht lobulierter Oberfläche und einem oder mehreren Tumorknoten, die durch dünne Bindegewebssepten voneinander getrennt sind. Man findet eine homogene Schnittfläche mit einer gelblichen bis sandfarbenen oder blass-braunen Färbung. Gelegentlich können körnige Kalzifikationen oder fibrotische Anteile auftreten. Beim chRCC finden sich in der Regel keine Nekrosen.

Mikroskopisch sind die, in breiten Trabekeln auftretenden, voluminösen und polygonalen Zellen auffallend, die durch ein fehlendes Anfärbeverhalten des Zytoplasmas in der H&E-Färbung namensgebend waren, was auf den hohen Glykogen- und Wassergehalt zurückzuführen ist. Charakteristisch sind Zellen mit fein retikulierten hellen, gelegentlich eosinophilen Zytoplasma, eine betonte Zellmembran sowie ein kompaktes Wachstumsmuster (Amann et al., 2015). Die Hale-Färbung führt beim chRCC zu einer typischen diffusen zytoplasmatischen Anfärbung. In der Literatur werden verschiedene Varianten des chromophoben Nierenzellkarzinoms unterschieden: das klassische chRCC, das eosinophile chRCC und gemischte Formen (Ng et al., 2014).

Chromophobe Nierenzellkarzinome können spontan und hereditär auftreten. Zytogenetisch treten zahlreiche Monosomien auf, wie -1, -2, -6, -10, -13, -17 und -21 (van den Berg et al., 1993). Das hereditäre chRCC im Rahmen eines Birt-Hogg-Dube-Syndroms (BHDS) folgt einem autosomal-dominanten Erbgang. Hier wurde eine Mutation des Suppressorgens FLCN (Follikulin-Gen) auf Chromosom 17q11.2 gefunden (Amann et al., 2015; Yusenko, 2010). Neben chromophoben Nierenzellkarzinomen treten beim BHDS Fibrofollikulome der Haarfollikel an der oberen Thoraxapertur und im Gesicht sowie Lungenzysten und Spontanpneumothoraces ab dem 30. Lebensjahr auf.

In der immunhistochemischen Analyse zeigen chRCC eine starke Positivität für CK8/18 und für CK7, wohingegen die Expression von CK19 nur schwach positiv und für Vimentin negativ ist (Amann et al., 2015). EMA, E-Cadherin und KIT sind positiv, während CA-IX, CD10 und PAX2 negativ sind. Das Antigenpektrum gleicht dem der renalen Onkozytome (Ausnahme CK7, CD44s und CD44v6). Die klassische Variante des chRCC lässt sich einigermaßen gut von den anderen RCC-Entitäten unterscheiden, kann aber in Grenzfällen mit dem ccRCC verwechselt werden. Die eosinophile Variante kann mit anderen Entitäten mit granulärem Zytoplasma verwechselt werden, z.B. dem papillären RCC oder renalem Onkozytom. Eine korrekte Diagnose ist jedoch von entscheidender Bedeutung für die Wahl der Therapie, da chRCC ein besseres Überleben aufweisen als z.B. die klarzelligen Nierenzellkarzinome, jedoch im Vergleich zu den renalen Onkozytomen eine Metastasierungstendenz aufweisen (Ng et al., 2014).

1.1.3 Das renale Onkozytom (RO)

Das renale Onkozytom stellt die häufigste benigne Neoplasie der erwachsenen humanen Niere dar. Es macht einen Anteil von etwa 5 - 9% aller renalen Neoplasien aus und wurde erstmals 1942 von Zippel beschrieben (Zippel, 1942; Ng et al., 2014). Bei dem renalen Onkozytom handelt es sich um eine Tumorerkrankung des älteren Menschen. Die Inzidenz nimmt im höheren Lebensalter deutlich zu, mit einem Höhepunkt in der siebten Lebensdekade. Bei der geschlechtsspezifischen Inzidenz kommt dem renalen Onkozytom eine Sonderrolle zu. Während alle anderen benignen renalen Neoplasien gehäuft bei Frauen auftreten (z.B. Angiomyolipom 2,55-fach erhöhtes Risiko beim weiblichen Geschlecht), sind im Fall des renalen Onkozytoms Männer doppelt so häufig betroffen (Mauermann et al., 2013; Ng et al., 2014). Bei Erstdiagnose weist das RO eine durchschnittliche Größe von etwa $4,9 \pm 2,7$ cm auf und ist laut weltweiten Studien in 6-11% der Fälle multifokal (Ng et al., 2014). Das renale Onkozytom entstammt histogenetisch, ähnlich dem chromophoben Nierenzellkarzinom, den distalen Abschnitten des Tubulusepithels bzw. den kortikalen Anteilen des Sammelrohrsystems (Ng et al., 2014).

Makroskopisch erscheinen renale Onkozytome als scharf abgrenzbare, solitäre, selten synchron multipel auftretende, kugelige Tumoren mit einer leicht lobulierten Oberfläche (Amann et al., 2015). Die homogene Schnittfläche stellt sich unfixiert gleichmäßig dunkel- bzw. rehraun dar, nach Fixierung in einer hellbraunen Farbe. Renale Onkozytome sind solide und nur gelegentlich (< 5%) wurde ein spongiformes Muster beschrieben, welches mit eingebluteter tubulozystischen Formationen einhergeht (Amann et al., 2015). Tumoren mit einer Größe über 3 cm im Durchmesser können eine zentrale sternförmige Narbe entwickeln. In der Regel finden sich beim RO keine Nekrosen (Amann et al., 2015).

Renale Onkozytome sind mikroskopisch charakterisiert durch Zellen mit einer grob granulären zytoplasmatischen Eosinophilie, einem kompakten soliden und azinären Wachstumsmuster und ohne peritumorale Pseudokapsel. Üblicherweise sind renale Onkozyten große isomorphe Tumorzellen mit einem grob granulären eosinophilen Zytoplasma, was durch eine deutliche Vermehrung der Mitochondrien entsteht. Die Zellkerne sind rund und zentralständig und weisen einen kleinen Nukleolus auf. Ebenfalls charakteristisch für das RO sind ausgeprägte Kernatypien (Polyploidisierung) und Zeichen der Zellteilungsstörung (doppelkernige und mehrkernige Zellen). Mitosen finden sich fast nie (Amann et al., 2015). Die Hale-Färbung kann punktförmig zytoplasmatisch oder apikal schwach ausgeprägt sein. In der Literatur wird der sogenannte Hybridtumor als histologische

Variante des RO beschrieben (Amann et al., 2015). Dabei handelt es sich um die Übergangsform zwischen einem renalen Onkozytom und dem chromophoben Nierenzellkarzinom oder einem Tumor, der Merkmale von beiden Tumorentitäten aufweist. Das Auftreten solcher Hybriddumoren wird beispielsweise im Rahmen des Birt-Hogg-Dubé-Syndroms oder bei der renalen Onkozytomatose beobachtet (Amann et al., 2015).

Renale Onkozytome treten in der Mehrzahl spontan auf. Genetisch werden zwei unterschiedliche Phänotypen bei dem gleichen morphologischen Phänotyp beschrieben: einer wird durch die Translokation $t(5;11)(q35;q13)$ oder $(9;11)(p23;q13)$ charakterisiert, der andere genetische Phänotyp durch eine Monosomie -1, -Y (Amann et al., 2015; Presti et al., 1996).

In der immunhistochemischen Analyse zeigen die renalen Onkozytome eine Positivität für Panzytokeratin. CK7 wird dagegen fokal nur gering exprimiert. Die Vimentin-Koexpression sowie die Marker des proximalen Tubulussystems (z.B. CA-IX, AMACR, CD10 und PNRA) sind negativ. Eine positive Markierung ergeben Parvalbumin, E-Cadherin und PAX2. Die Mib-1-Proliferationsrate liegt bei 1% (Amann et al., 2015).

Aufgrund seiner benignen Natur zeigt das renale Onkozytom in der Regel keine Metastasierungstendenz. Bisher konnte nur in einem Case-Report von einer Metastasierung von einem RO berichtet werden (Oxley et al., 2007). Daher lautet das konservative Therapieregime für die renalen Onkozytome zunächst aktive Überwachung (active surveillance) und beinhaltet regelmäßige bildgebende Kontrollen mittels Computertomographie. Trotz der enormen technischen Verbesserung dieser Methode ist eine Unterscheidung von RO und ccRCC möglich (Choudhary et al., 2009), aber nicht von chRCC. Deswegen muss bei der Diagnose „renales Onkozytom“ differentialdiagnostisch auch immer das Vorliegen von chRCC (eosinophile Variante) und papilläres onkozytoides RCC bedacht werden (Ng et al., 2014).

1.2 Rezeptortyrosinkinase KIT

Bei der Tyrosinkinase KIT (auch CD117, c-Kit oder Stammzellfaktor-Rezeptor) handelt es sich um eine Typ-III-Rezeptortyrosinkinase. Sie ist ein in der Zellmembran verschiedener Körperzellen vorkommendes Protein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dieses Protein wird durch das Protoonkogen *c-kit* codiert und ist beim Menschen auf dem Chromosomensegment 4q11-12 lokalisiert. Das gesamte Gen besitzt 21 Exons und hat eine Größe von mehr als 34 kb DNA (Lennartsson et al., 2012; Roberts et al., 2015).

Die Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen sind durch das Vorkommen von immunglobulinähnlichen Domänen und einer Kinasedomäne charakterisiert. Im Falle von c-Kit sind die immunglobulinähnlichen Domänen extrazellulär lokalisiert, während sich die Kinasedomäne intrazellulär befindet. Das Protein c-Kit weist ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa auf (Lennartsson et al., 2012).

KIT wird insbesondere in hämatopoetischen Stammzellen gebildet, kommt aber auch in einer Reihe von anderen Zelllinien vor. Als Rezeptorprotein kann KIT durch seinen Liganden, dem Stammzellfaktor (SCF), aktiviert werden. Der phosphorylierte und somit aktivierte Rezeptor dient als Bindungsstelle für weitere Signaltransduktionsmoleküle (Abbildung 2). Dazu zählen beispielsweise die Kinasen der Src-Familie, die Januskinase JAK2 und die Phosphoinositid-3-Kinasen, welche ihrerseits eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen aktivieren können (Lennartsson et al., 2012; Roberts et al., 2015).

Somit spielt der transmembranäre Tyrosinkinase-Rezeptor KIT eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und ist von großer Bedeutung für die Hämatopoese, Angiogenese, Spermatogenese und das Zellwachstum.

Das Vorhandensein einer c-KIT-Überexpression wurde bereits bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben, dazu zählen der Gastrointestinale Stromatumor (GIST), die akute myeloische Leukämie, Keimzelltumoren, Melanome, Mastrozytosen und Mastzelltumoren sowie das Ewing-Sarkom (Lennartsson et al., 2012; Krüger et al., 2005).

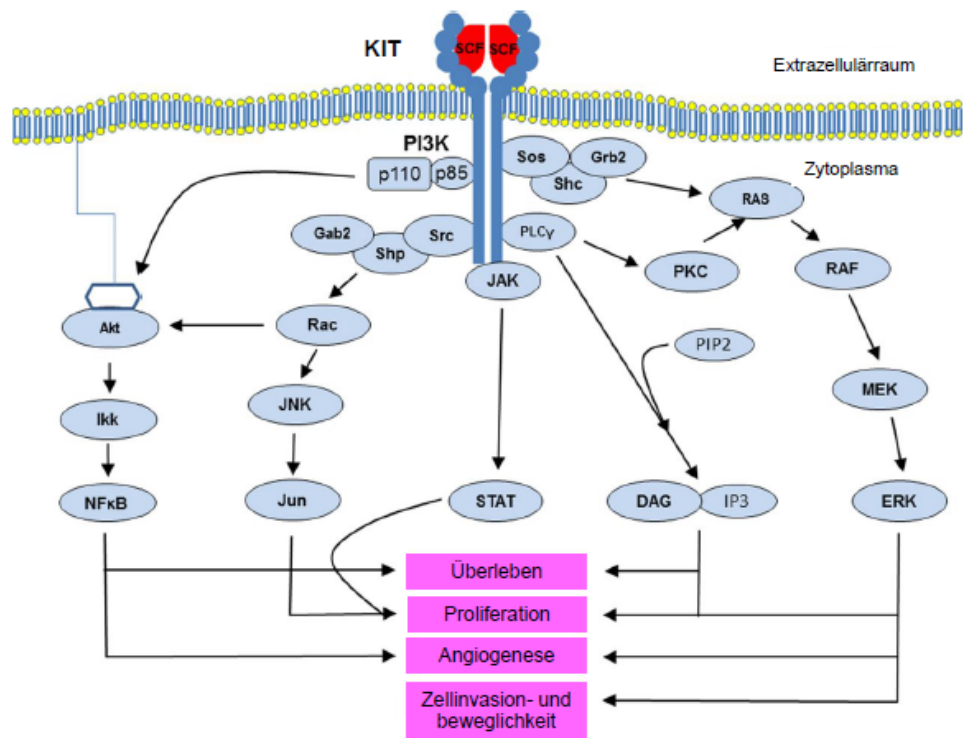


Abbildung 2: Signaltransduktionskaskade der Rezeptortyrosinkinase KIT. Akt, RAC- α serine/threonine-protein kinase; DAG, diacylglycerol; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; Gab2, GRB2-associated-binding protein 2; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; Ikk, inhibitor of kappa B kinase; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; JAK, Janus kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinases; Jun, proto-oncogene c-jun; MEK, mitogen/extracellular signal-regulated kinase; NFκB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PI3K p85, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (p85 subunit); PI3K p110, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit α (p110 subunit); PIP2, phosphatidylinositol biphosphate; PKC, protein kinase C; PLCγ, phospholipase C γ ; Rac, RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1; RAS, rat sarcoma viral oncogene homologue; RTK-KIT, receptor tyrosine kinase v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homologue; SCF, stem cell factor; Shc, SHC-transforming protein 1; Shp, small heterodimer partner; Sos, son of sevenless homologue 1; Src, sarcoma tyrosine-protein kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription. modifiziert nach (Roberts et al., 2015)

Auch in Bezug auf die nicht erkrankte Niere und humane Nierentumoren wurden bereits die Expressionsmuster von c-Kit analysiert (Kato et al., 2005). Dabei konnte in einigen Arbeiten bei humanen Nierenzelltumoren (Huo et al., 2005; Kato et al., 2005) eine Expression von c-Kit in Membranen und im Zytoplasma der distalen Tubuli und des Sammelrohrsystems nachgewiesen werden. Bei renalen Neoplasien lässt sich ein deutlicher Unterschied in der c-Kit-Expression zwischen den verschiedenen Tumorentitäten zeigen (Huo et al., 2005; Kato et al., 2005; Krüger et al., 2005; Li et al., 2005; Miliaras et al., 2004). Während das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom kaum bzw. keine c-Kit-Expression zeigen, konnte für das chromophobe Nierenzellkarzinom und das renale Onkozytom eine deutlich stärkere Expression gezeigt werden (Huo et al., 2005; Kato et al., 2005; Krüger et al., 2005; Li et al.,

2005; Miliaras et al., 2004). Dies bestätigt die bereits o.g. Aussage, dass das chromophobe Nierenzellkarzinom vom distalen Tubulus- bzw. Sammelrohrsystem abgeleitet ist. Ähnlich ist es mit dem histochemisch und immunhistochemisch verwandten renalen Onkozytom. Hinsichtlich der Häufigkeiten der c-Kit-Expression in chromophoben Nierenzellkarzinomen lässt sich in der Literatur ein Bereich von 57 bis 100% finden (Huo et al., 2005). Beim renalen Onkozytom ist dieser Bereich mit 71 bis 100% deutlich weniger variabel. Bei dem am häufigsten auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinom lässt sich lediglich eine Häufigkeit von 1% nachweisen (Huo et al., 2005).

1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) und mTOR-Inhibitoren in der Therapie von humanen Nierenzellkarzinomen

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde eine Reihe von Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt, die bei hämatologischen Erkrankungen und verschiedenen Tumoren, beispielsweise den Nierentumoren, erfolgreich eingesetzt werden. Bei diesen Substanzen handelt es sich um sogenannte „small molecules“, die spezifisch eine oder mehrere Tyrosinkinasen, die bei der Tumorigenese eine entscheidende Rolle spielen, inhibieren. Im Folgenden wird eine Auswahl der wichtigsten Tyrosinkinase-Inhibitoren sowie mTOR-Inhibitoren, die bei der Therapie von humanen Nierentumoren eingesetzt werden (Abbildung 3), bezüglich ihrer pharmakologischen Wirkung und ihrer klinischen Effektivität vorgestellt.

Sorafenib war der erste für die Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zugelassene TKI. Es handelt sich um einen Multi-Kinase-Inhibitor, der sowohl die Proliferation von Tumorzellen durch Aktivitätshemmung vorhandener Targets verhindert, als auch anti-angiogene Eigenschaften zeigt. Sorafenib hat einen inhibitorischen Effekt auf c-Kit (siehe oben), platelet-derived growth factor-receptor (PDGF-R), Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt-3), vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R), Raf-1 Kinase (Raf1 Kin) und fibroblast growth factor receptor (FGFR). Sorafenib verbesserte in einer Studie als Zweitlinientherapie das progressionsfreie Überleben (PFS) beim klarzelligen Nierenzellkarzinom von 2,8 (Median) Monaten auf 5,5 Monate im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Escudier, 2007). In der Erstlinientherapie ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Remissionsrate und im PFS im Vergleich zu Interferon α .

Sunitinib ist ein zurzeit empfohlener Wirkstoff bei der Erstlinienbehandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Abbildung 3). Es ist ein oraler Inhibitor der Tyrosin-Kinasen c-Kit, PDGF-R, Flt-3, epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1) und VEGF-R. Das mediane progressionsfreie Überleben wurde durch Sunitinib im Vergleich zur Interferon α -Therapie signifikant von 5 Monaten auf 11 Monate verlängert (Motzer et al., 2007b).

Ein ebenfalls für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassener TKI ist das Pazopanib (Abbildung 3). Es ist ein Inhibitor des VEGF-R-1, -2 und -3 sowie PDGF-R und c-Kit. Das mediane Gesamt-Überleben (OS) wurde durch Pazopanib im Vergleich zur Placebo-Gruppe von 20,5 Monate auf 22,9 Monate verlängert (Novartis, 2015b).

Der Tyrosinkinase-Inhibitor Axitinib ist in der Zweitlinientherapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen (Abbildung 3). Diese Substanz hemmt die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. In einer Studie (Pfizer, 2015), bei der Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom auf eine Therapie mit Sunitinib bzw. Zytokinen (Interferon α) progredient waren, wurde die Wirksamkeit von Axitinib im Vergleich zu Sorafenib verglichen. Dabei konnte sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der Subgruppenanalyse (Vorthherapie mit Sunitinib oder Zytokinen) ein verlängertes progressionsfreies Überleben für Axitinib im Vergleich zu Sorafenib gezeigt werden. In der Gesamtpopulation zeigte sich unter Axitinib ein progressionsfreies Überleben (PFS) von 6,8 Monaten im Vergleich zu 4,7 Monaten bei Sorafenib (Pfizer, 2015).

Einer der zuerst zugelassenen TKI war Imatinib. Dieses stellt zwar keine zugelassene Therapieoption des Nierenzellkarzinoms dar, soll jedoch aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaften auf c-Kit (siehe oben) sowie das Fusionsprotein BCR/Abl und dem PDGF-R genannt werden. Imatinib ist u.a. zugelassen bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie, den myelodysplastischen Erkrankungen (MDS) sowie bei der Behandlung von c-Kit-(CD 117)-positiver nicht zu resezierender maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST), (Novartis, 2015a).

Aus der Gruppe der mTOR- (mammalian target of rapamycin) Kinase-Inhibitoren stellt Temsirolimus die erste für das Nierenzellkarzinom zugelassene Substanz dar. Temsirolimus ist ein selektiver Hemmstoff dieser Serin/Threonin-Kinase, die einen Einfluss auf den Zellzyklus und die Zellteilung hat. Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und einer ungünstigen Prognose (Abbildung 3) nach dem Memorial Sloan - Kettering Cancer Center Prognostic Score zeigte die Monotherapie mit Temsirolimus im Vergleich zur Monotherapie

mit Interferon-Alpha ein signifikant verlängertes PFS von 5,6 Monaten im Vergleich zu 3,2 Monaten. Auch das mediane Gesamtüberleben (OS) wurde durch Temsirolimus im Vergleich zur Interferon α -Therapie von 7,3 Monaten auf 10,9 Monate verlängert (Hudes et al., 2007; Motzer et al., 2007a; Pfizer 2018).

Bevacizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der die Angiogenese durch Inaktivierung des VEGF-A hemmt. Er wird in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms in Kombination mit Interferon-Alpha verwendet (Abbildung 3). In einer klinischen Studie konnte eine Verlängerung des PFS bei der Kombination von Bevacizumab mit Interferon-Alpha von 10,2 Monaten im Vergleich zur Monotherapie mit Interferon-Alpha von 5,4 Monaten nachgewiesen werden (Rini et al., 2008; Roche 2018).

Interferon-Alpha (IFN- α) ist ein Zytokin aus der Interferon-Familie. Es zeigt vielfältige immunologische Wirkungen, die in der Lage sind, das Tumorzellwachstum zu beeinflussen. Es ist sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit Bevacizumab (siehe oben) für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms empfohlen (Rini et al., 2008).

Interleukin -2 (IL-2) ist ein immunologischer Mediator, der von T-Lymphozyten synthetisiert wird und diese auch stimulieren kann. Bis zur Einführung der neuen „small molecules“ stellte IL-2 die Standardtherapie beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom dar, obwohl in keiner Studie ein verbessertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte eine Studie bei einer Subgruppe von Patienten mit primären Knochen- oder Lebermetastasen unter der IL-2-Hochdosistherapie ein signifikant längeres Überleben zeigen (McDermott et al., 2005). Diese Beobachtungen wurden jedoch nicht durchgehend bestätigt. Deshalb ist die Bedeutung von IL-2 bei der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zurückgegangen und stellt somit nur noch eine Therapieoption bei Unverträglichkeit der neueren Substanzen dar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2017).

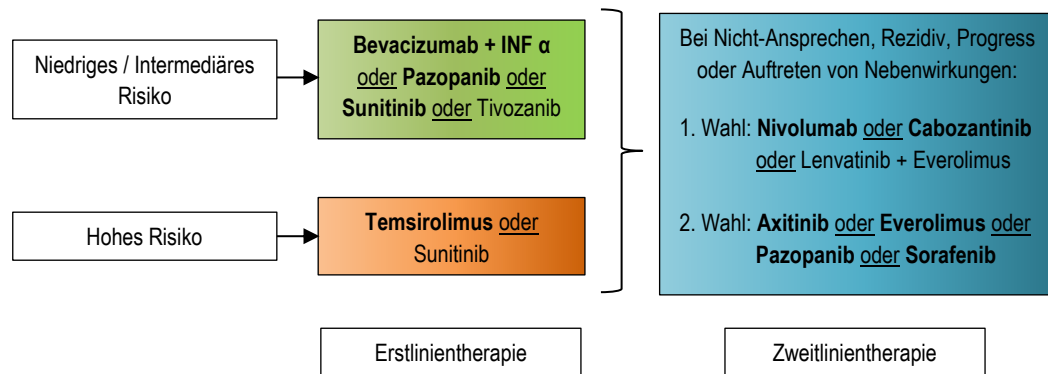


Abbildung 3: Empfehlung für medikamentöse Erst- und Zweitlinientherapie des fortgeschrittenen und/oder metastasierten Nierenzellkarzinoms. Der Einsatz der verschiedenen therapeutischen Optionen richtet sich dabei nach der Bewertung der Risikofaktoren nach MSKCC- (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) Score oder IMDC- (International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium) Score. Modifiziert nach S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, 2017.

1.4 Fragestellung und Ziele

Trotz weitgehender Fortschritte in der Therapie des humanen Nierenzellkarzinoms muss die Therapie des metastasierten, fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms als weitestgehend unbefriedigend betrachtet werden. Zur Lösung dieses Problems wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um die verschiedenen Entitäten beim Nierenzellkarzinom besser zu charakterisieren. Es ist bereits bekannt, dass die Tyrosinkinase c-Kit ein unterschiedliches Expressionsmuster bei verschiedenen Nierenzellkarzinomen hat. So ist z.B. bekannt, dass chromophobe Nierenzellkarzinome im Vergleich zu klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine deutliche Überexpression von c-Kit zeigen. Weiterhin ist auch bekannt, dass die Expression und die Aktivität des c-Kit durch verschiedene single-nukleotide-polymorphisms (SNPs) beeinflusst werden. Jedoch sind das Wissen und die Kenntnis über den Einfluss solcher SNPs auf die Expression von c-Kit beim chromophoben Nierenzellkarzinom noch sehr lückenhaft. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Herstellung von Tissue micro arrays (TMAs) von Patienten mit verschiedenen Nierenzellkarzinomentitäten und renalen Onkozytomen
- Bestimmung des Fuhrman-Grades, ein Maß zur Bestimmung der Differenzierung des Tumors (Grading), anhand H&E-gefärbten TMAs der verschiedenen Tumorentitäten

- Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Differenzierung der Tumoren (Grading nach Fuhrmann) und der TNM-Klassifikation
- Immunhistochemischer Nachweis von c-Kit an den TMAs von klarzelligen und chromophoben Nierenzellkarzinomen sowie renalen Onkozytomen
- DNA-Extraktion ausgewählter Fälle und Mutationsanalysen von chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen
- Vergleich des Expressionsmusters von c-Kit zwischen den verschiedenen Tumorentitäten der humanen Niere
- Analyse des Zusammenhangs von c-Kit Mutationen in humanen Nierentumoren mit der Expressionsstärke von c-Kit.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Mutation im KIT-Gen und der Expression von c-Kit in chromophoben Nierenzellkarzinomen sowie in renalen Onkozytomen zu detektieren und herauszuarbeiten ob die Expression und die Aktivität des c-Kit von Mutationen in den typischen Exons verursacht wird.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Materialien sowie Herstellerangaben

Chemikalien	Hersteller
Färbung	
Hämatoxylin – Lösung mod. nach Gill III	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eosin G – Lösung 0,5%, alkoholisch	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Formalin	Grimm MED Logistik GmbH, Torgelow/Vorpommern, Germany
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Immunhistochemie	
CD117 (Primär-AK gegen cKit)	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Immunperoxidase, peroxidasegekoppelter sekundärer anti-human-Antikörper	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Diaminobenzidin	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Entparaffinisierung	
Rothistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethanol	Apotheke Unimedizin Rostock
Isolierung der DNA	
Proteinase K	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Whylen, Germany
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
TRIS-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Wizard-DNA Clean-up Kit	Promega, Madison, WI
PCR Mutationsanalyse	
MyTaq HS Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany
PCR Puffer	Bioline GmbH, Luckenwald, Germany
Primer (Tabelle 4: Primersequenzen)	MWG-Biotech: Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany
Gel-Elektrophorese	
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Midori Green Direkt	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Bromphenolblau (BPB)	Thermo Scientific; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
100 bp Gene Ruler	ThermoFisher Scientific, Darmstadt

Chemikalien	Hersteller
Aufreinigung der PCR-Produkte	
Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific / Fermentas; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
Exonuklease 1	Thermo Scientific / Fermentas; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
Sanger-Sequenzierung	
Sequenzierungs-Kit	Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
BigDye 1.1	Thermo Scientific, Darmstadt
SAM-Solution	Thermo Scientific, Darmstadt
Xterminator	Thermo Scientific, Darmstadt
Material	Hersteller
Verbrauchsmaterial	
Beschichtete Objektträger	Dako / Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, USA
Gewebe-Einbettkassetten	KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Germany
Einbettmedium	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Reaktionsgefäße 0,6 ml (Tubes)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Tubes)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany
Mikrotiterplatte für Sequenzierreaktion (96 Kavitäten)	Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
Geräte	
Mikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Immunostainer	Daco Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Vortexer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
Elektrophoresekammer und Gelträger	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Geldokumentation (UV-Lampe, Thermodruckerpapier)	Mitsubishi Electric, Germany; Peqlab – VWR International GmbH, Erlangen, Germany
Sequenzier	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Cycler	Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Germany
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Germany
Lichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Germany
Kamera	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany

2.2 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Querschnittsstudie von Patienten mit Nierentumoren. Es wurden insgesamt 948 Patienten mit primären Nierentumoren eingeschlossen. Darunter befanden sich 649 klarzellige Nierenzellkarzinome, 155 papilläre Nierenzellkarzinome, 69 chromophobe Nierenzellkarzinome, 45 renale Onkozytome und 30 unklassifizierte Nierenzellkarzinome. Von diesen Patienten standen formalinfixierte Paraffinproben aus den Gewebebanken der pathologischen Institute der Universität Rostock und der Charité Berlin zur Verfügung. Die Diagnosen wurden im Zeitraum von 1992 bis 2012 gestellt. Die operative Therapie der Nierentumoren erfolgte an den Kliniken für Urologie der Universität Rostock und der Charité Berlin. Alle Fälle wurden reklassifiziert nach der WHO von 2004 (Lopez-Beltran et al., 2006). Die Stadieneinteilung der Nierenzellkarzinome erfolgte anhand der TNM-Klassifikation der UICC aus dem Jahr 2010 (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach TNM [UICC 2010]

T (= Tumor) – Tumorausdehnung des Primärtumor	
TX	Primärtumor konnte nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, $\leq 7,0$ cm in größter Ausdehnung
T1a	Tumor $< 4,0$ cm in größter Ausdehnung
T1b	Tumor $> 4,0$ cm bis $7,0$ cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, $> 7,0$ cm in größter Ausdehnung
T2a	Tumor $> 7,0$ cm bis 10 cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor > 10 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere, Nierenvene oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder V. cava inferior (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. cava inferior (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus, einschließlich zusammenhängender Ausdehnung in die ipsilaterale Nebenniere
N (= Node) – (Regionale) Lymphknotenmetastasen	
NX	Regionale Lymphknoten konnten nicht beurteilt werden
N0	Kein Befall der lokalen Lymphknoten nachweisbar
N1	Metastase in einem einzigen lokalen Lymphknoten (< 2 cm)
N2	Metastasen in einem einzigen lokalen Lymphknoten (> 2 bis < 5 cm); oder Metastasen in mehr als einem lokalen Lymphknoten wobei < 5 cm
N3	Metastasen in lokalen Lymphknoten (> 5 cm)
M (= Metastasis) – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen konnten nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Vorliegen von Fernmetastasen

Stadieneinteilung			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IV	T1-3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
	T1-4	N2	M0
	T1-4	N0-2	M1
Grading			
G1	gut differenziert		
G2	mäßig differenziert		
G3	schlecht differenziert		
G4	undifferenziert		

Die klinischen Patientendaten wurden aus dem Krebsregister Rostock erhoben. Diese Daten wurden in pseudoanonymisierter Form verwendet.

2.3 Tissue Microarray (TMA)

Für die Durchführung der TMAs wurden zunächst mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung repräsentative Tumorregionen von aufgearbeiteten Paraffinschnitten makroskopisch identifiziert. Die H&E-Färbung stellt eine histologische Standardfärbung dar (siehe Tabelle 4). Sie dient als Übersichtsfärbung und kann die Unterscheidung der untersuchten Gewebestruktur in normal, entzündlich verändert oder pathologisch ermöglichen. Für diese Arbeit wurde die H&E-Färbung nach dem Standardfärbeprotokoll der Firma Merck durchgeführt. Die in Xylol entparaffinierten und mittels absteigender Alkoholreihe (Ethanol 96%, 80%, 70%, 60%) rehydratisierten Schnitte wurden zunächst in Hämatoxylinlösung, modifiziert nach Gill III, für 3 Minuten gefärbt. Nach anschließender Spülung (HCl-Lösung 0,1% für 2 Sekunden) und Differenzierung unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Färbung in Eosin G-Lösung 0,5% wässrig und Eosin G-Lösung 0,1% wässrig für jeweils 3 Minuten. Danach wurden die Objektträger erneut unter fließendem Leitungswasser gespült. Die nachfolgende Entwässerung wurde mittels ansteigender Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96%) und Xylol durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Einbettmedium eingedeckt.

Tabelle 4: Ergebnisse nach H&E-Färbung aufgeschlüsselt nach Farben

Ergebnisse	
Kerne	dunkelblau
Zytoplasma	rot – orange
Kollagen, Elastin, Erythrozyten	gelb – orange

Aus den dazugehörigen Paraffinblöcken wurden entsprechend identifizierte Bereiche mit Hilfe eines Präzisionsinstrumentes (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 bzw. 1,0 mm ausgestanzt und einem neuen Paraffinblock zugeführt. Die so angefertigten 30 neuen Paraffinblöcke enthielten jeweils vier Tumorstansen und eine Stanze aus normalem Nierengewebe pro Patient (Material der Universität Rostock, siehe Abbildung 4). Bei den TMAs aus den Gewebeproben der Charité Berlin wurden jeweils drei Tumorgewebs- und zwei normale Nierengewebszylinder verarbeitet. Von den TMA-Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf beschichtete Objektträger (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ, USA) transferiert.

Des Weiteren wurde von den H&E-gefärbten TMAs die Graduierung nach Fuhrmann vorgenommen. Damit wurde der Differenzierungsgrad der entarteten bzw. malignen Zellen bestimmt. Die Kriterien für die Fuhrmann-Graduierung sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Kriterien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von entarteten Zellen nach Fuhrmann (Fuhrman et al., 1982).

Fuhrmann-Grad	Kerngröße	Kernform	Chromatin	Nukleolen
1	< 10 µm	rund uniform	kondensiert	keine
2	15 µm	rund, uniform	fein granulär	rudimentär, nicht sichtbar bei kleiner Vergrößerung (10er oder besser 20er Objektiv)
3	20 µm	rund bis oval, leicht variabel	grob granulär	sichtbar bei kleiner Vergrößerung
4	> 20 µm	pleomorph, lobuliert	hyperchromatisch	große Makronukleolen

2.4 Immunhistochemie

Die o.g. neu angefertigten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe einer H&E-Färbung auf ihren Anteil an Tumorgewebe mikroskopisch analysiert. Es wurden dabei für die folgende Untersuchung nur Gewebsschnitte mit einem mindestens 10-prozentigen Tumorgewebsanteil verwendet. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte eine Antigen-Retrieval für 20 Minuten bei 97°C und einem pH-Wert von 9. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen c-Kit [CD117, (p145, polyklonaler Antikörper Kaninchen gegen Mensch, DAKO GmbH)]. Die Färbung wurde mit einer Immunperoxidasetechnik (peroxidasegekoppelter sekundärer anti-human-Antikörper, DAKO) und dem Farbstoff Diaminobenzidin durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde normales Nierengewebe verwendet. Die c-Kit-Expression wurde definiert als spezifische Membranfärbung in mehr als 2 % der Tumorzellen. Zur Evaluierung der c-Kit-Überexpression wurde der modifizierte Allred-Score verwendet (Allred et al., 1998; Zimpfer et al., 2014). Die c-Kit Expression errechnete sich aus dem Produkt der Intensität der Färbung und dem prozentualen angefärbten Gewebsanteil. Die Intensität der Färbung wurde folgendermaßen definiert: 0 – keine Färbung, 1 – schwache Färbung, 2 – mittelmäßige Färbung und 3 – starke Färbung. Der prozentuale angefärbte Gewebsanteil hatte folgende Definition: 0 – keine Färbung, 1 - < 10 % Färbung, 2 – 10 bis 50 % Färbung, 3 – 51 bis 80 % Färbung und 4 - > 80 % Färbung. Daraus ergab sich eine Gesamtpunktzahl (Gesamt-c-Kit-Score) von 0 bis 12, wobei Werte über 4 als c-Kit Überexpression gewertet wurden. Die Gesamtpunktzahl von 0 wurde dabei als negative, ein Wert von 1 bis 4 als schwache, von 6 bis 8 als moderat positive und von 9 bis 12 als stark positive Expression definiert.

2.5 c-Kit Mutationsanalyse

Isolierung der DNA / Extraktion

Die Isolierung der Tumor-DNA erfolgte aus den ausgewählten Paraffinschnitten. Zunächst musste das Gewebe entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte zunächst in 1 ml Rothistol (Roth) in einem Tube gelöst, 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die DNA wurde mittels zweimaliger Lösung in 1 ml Ethanol (100%) extrahiert (Hydratisierung) und danach luftgetrocknet. Zur Auflösung der Zellmembran sowie zum proteolytischen Abbau der Zellproteine erfolgte die Zugabe von 200

µl Extraktionspuffer und 20 µl Proteinase K (Roche) (Proteinase K-Verdau). Im Anschluss wurden die Proben bei 56°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten. Die DNA wurde anschließend mit dem Wizard DNA-Clean up-System (Promega) aufgereinigt und die DNA in 50 µl A. bidest gelöst. Die Aufreinigung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde anschließend photometrisch bestimmt (Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm). Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Amplifikation spezifischer Sequenzen

Die Polymeraseketten-Reaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von geringen Mengen spezifischer DNA in-vitro. Es handelt sich um ein enzymabhängiges Verfahren. Für die Durchführung benötigt man eine zu duplizierende DNA, sequenzspezifische Primer, Nukleosidtriphosphat-Moleküle (dATP dCTP, dGTP und dTTP) und eine hitzestabile Polymerase, sowie einen PCR-Cycler. Der Ablauf der PCR gliedert sich in mehrere Schritte: DNA-Denaturierung, Primer-DNA-Bindung, Polymerase-Bindung und DNA-Synthese, erneute Denaturierung und erneute DNA-Synthese mit DNA-Kettenelongation. Diese Abfolge kann so lange wiederholt werden bis die benötigte DNA-Menge synthetisiert worden ist. Dabei erfolgt die Amplifizierung exponentiell.

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel *c-kit* zu amplifizieren. Dafür wurden die o.g. isolierten DNA-Proben als Template für die sequenzspezifische PCR verwendet. Als Polymerase diente die aus *Thermus aquaticus* isolierte MyTaq-DNA-Polymerase (Bioline). Es wurden die Exons 9, 11, 13, 14, 15 und 17 von *c-kit* amplifiziert (siehe Tabelle 6). Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle durchgeführt um eine Kontamination des PCR-Ansatzes durch DNA ausschließen zu können.

Der PCR-Ansatz für eine Reaktion á 25 µl (sog. „Mastermix“) enthielt je:

- 5 µl 5x PCR Puffer
- 1 µM Forward-(F)-Primer (siehe Tabelle 6)
- 1 µM Reverse-(R)-Primer (siehe Tabelle 6)
- 0,2 µl MyTaq-DNA-Polymerase (MyTaqHS)
- 75 ng DNA
- H₂O

Nach anschließendem Zentrifugieren wurde die PCR im PCR-Cycler nach folgenden Schritten amplifiziert:

Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten

Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden

Annealing bei 56°C für 30 Sekunden

Extension bei 72°C für 45 Sekunden

35 Zyklen

Abschließende Extension bei 72°C für 10 Minuten

Die Reaktion wurde mit einem Herunterkühlen auf 4°C abgeschlossen.

Tabelle 6: Primersequenzen, die für die Genamplifikation und Sequenzierung der Exons 9, 11, 13, 14, 15 und 17 des *c-kit* verwendet wurden.

Exon	Primersequenzen	Produktgröße (bp)
9	5'-GCCACATCCCAAGTGTTTTATG-3' 5'-GAGCCTAAACATCCCCTTAAATTG-3'	310
11	5'-TCTCCAGAGTGCTCTAATGACTGA-3' 5'-AAAACAAAGGAAGCCACTGGA-3'	285
13	5'-CTTGACATCAGTTTGCCAGTTGTT-3' 5'-CCAAGCAGTTTATAATCTAGCATTGC-3'	264
14	5'-GGTATTTTTATGGGAGGCAGAA-3' 5'-GCCTTGATTGCAAACCCTTA-3'	296
15	5'-GACCCATGAGTGCCCTTCTA-3' 5'-CATTGCTACTGGGAATGATGTT-3'	250
17	5'-TGGTTTTCTTTCTCCTCCAA-3' 5'-GCAGGACTGTCAAGCAGAGA-3'	184

Gelelektrophorese

Nach Abschluss der PCR wurde die Gelelektrophorese durchgeführt, in der die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt wurden. Folgende Materialien wurden dafür verwendet:

2 g Agarose

100 ml TAE Puffer

6 µl Midori Green

Das Gel wurde unter möglichst blasenfreiem Ausgießen auf die vorbereiteten UV-transparenten Geltablets mit kompatiblen Kämmen transferiert.

In die Kammtaschen des Agarose-Gels wurden jeweils die PCR-Produkte mit 1 µl Bromphenolblau (Farbstoff) vermischt aufgetragen. In die erste Tasche jeder Reihe wurde der Marker 100 bp Gene Ruler (Thermo Fisher Scientific) als Kontrolle aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer für 30 Minuten bei 90 V durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Fotodokumentation unter UV-Licht auf einem Transilluminator. Das sich in die DNA eingelagerte Midori Green wurde durch das UV-Licht zur Emission von Fluoreszenzstrahlung angeregt.

Aufreinigung des PCR-Produktes für die Sequenzierreaktion

Um eine möglichst fehlerfreie Sequenzierung zu erreichen, müssen die entstandenen freien Enden der PCR-Produkte beseitigt werden. Am 5'-Ende erfolgte dies durch eine alkalische Phosphatase und am 3'-Ende mit Hilfe einer Exonuklease.

Zugabe von 3 µl alkalischer Phosphatase und 1,5 µl Exonuklease 1

Inkubation für 15 Minuten bei 37°C

Inaktivierung der Enzyme für 15 Minuten bei 85°C

Sequenzierung und Sequenzierungsanalyse

Die Sequenzierung wurde in der vorliegenden Studie unter Nutzung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Zunächst wurde ein Mastermix folgender Zusammensetzung hergestellt:

0,875 µl BDX64

1,5 µl 5x BD Puffer

0,125 µl BigDye

5,5 µl H₂O

Für die Sequenzierungs-PCR werden 10 µl Reaktionsvolumen benötigt: je 8 µl des Mastermix, 1 µl des Forward- oder Reverse-Primer des zu sequenzierenden Gens sowie 1 µl des jeweiligen PCR-Produktes. Die Sequenzierung erfolgte in 25 Zyklen nach diesem Schema:

Start bei 96°C für 1 Minute

Schmelzen der DNA bei 96°C für 10 Sekunden

Primerhybridisierung bei 50°C für 5 Sekunden

Elongation bei 60°C für 4 Minuten

Für die anschließende Aufreinigung der Sequenzierungs-Produkte wurden je 10 µl des Sequenzierungsproduktes in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und mit 45 µl SAM-Solution sowie 10 µl XTerminator vermischt. Danach wurde die Platte auf einem Schüttler für 30 Minuten bei 2300 U/min geschüttelt und anschließend für 2 Minuten zentrifugiert. Danach konnten die Sequenzierungs-Produkte im 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert werden. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der c-Kit Referenz-Sequenz (ENSG00000157404) unter Zuhilfenahme der SeqScape® Software v2.7 (Applied Biosystems) verglichen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Statistical Package of Social Sciences (SPSS 21.0, IBM). Für die statische Auswertung hinsichtlich Erkrankungshäufigkeit bezogen auf Geschlecht und Alter wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Bezüglich der c-Kit-Expression und der Tumorentitäten sowie des pTNM-Status wurde ebenfalls der Chi-Quadrat-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

In der vorliegenden Studienpopulation zeigte sich im Chi-Quadrat-Test, dass signifikant mehr Männer als Frauen an den untersuchten Nierenzellkarzinomen erkrankt waren ($p=0,031$). Das entspricht einer Anzahl von 630 Männern (66,9%) und 312 Frauen (33,1%).

Tabelle 7: Absolute und prozentuale Häufigkeiten der in die Studie eingeschlossenen Patienten hinsichtlich ihres Geschlechts und Tumorentität. Weiterhin ist das Alter in Jahren zum Zeitpunkt einer operativen Intervention in Mittelwert \pm Standardabweichung / Median angegeben.

		Geschlecht		Gesamt
		männlich	weiblich	
Chromophobes Nierenzellkarzinom	N	39	28	67
	% Tumorentität	58,2%	41,8%	100,0%
	% Gesamtzahl	4,1%	3,0%	7,1%
	Alter bei OP	58 \pm 11 / 57	61 \pm 14 / 64	59 \pm 12 / 59
Renales Onkozytom	N	27	18	45
	% Tumorentität	60,0%	40,0%	100,0%
	% Gesamtzahl	2,9%	1,9%	4,8%
	Alter bei OP	70 \pm 10 / 70	63 \pm 14 / 67	67 \pm 12 / 68
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	N	396	217	613
	% Tumorentität	64,6%	35,4%	100,0%
	% Gesamtzahl	42,0%	23,0%	65,1%
	Alter bei OP	62 \pm 10 / 62	63 \pm 11 / 64	62 \pm 10 / 63
Papilläres Nierenzellkarzinom	N	118	32	150
	% Tumorentität	78,7%	21,3%	100,0%
	% Gesamtzahl	12,5%	3,4%	15,9%
	Alter bei OP	62 \pm 11 / 62	69 \pm 12 / 72	63 \pm 12 / 64
Sarkomatoides Nierenzellkarzinom	N	37	14	51
	% Tumorentität	72,5%	27,5%	100,0%
	% Gesamtzahl	3,9%	1,5%	5,4%
	Alter bei OP	61 \pm 12 / 61	66 \pm 9 / 65	62 \pm 11 / 62
Nierenzellkarzinom ohne nähere Angaben	N	9	2	11
	% Tumorentität	81,8%	18,2%	100,0%
	% Gesamtzahl	1,0%	0,2%	1,2%
	Alter bei OP	66 \pm 12 / 69	61 \pm 0 / 61	65 \pm 11 / 64
Urothelkarzinom	N	2	1	3
	% Tumorentität	66,7%	33,3%	100,0%
	% Gesamtzahl	0,2%	0,1%	0,3%
	Alter bei OP	59 \pm 16 / 59	94 \pm 0 / 94	70 \pm 24 / 70
Tubulopapilläres Nierenzellkarzinom	N	1	0	1
	% Tumorentität	100,0%	0,0%	100,0%
	% Gesamtzahl	0,1%	0,0%	0,1%
	Alter bei OP	42 \pm 0 / 42	0 \pm 0 / 0	42 \pm 0 / 42
Unbekannt	N	1	0	1
	% Tumorentität	100,0%	0,0%	100,0%
	% Gesamtzahl	0,1%	0,0%	0,1%
	Alter bei OP	35 \pm 0 / 35	0 \pm 0 / 0	35 \pm 0 / 35
Gesamt	N	630	312	942
	% Gesamtzahl	66,9%	33,1%	100,0%
	Alter bei OP	62 \pm 11 / 62	64 \pm 11 / 65	62 \pm 11 / 63

Bezüglich des Alters bei operativer Intervention zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die detaillierten Patientenzahlen hinsichtlich Geschlecht und Tumorentität sind in Tabelle 7 gezeigt. Die häufigste Tumorentität war mit 65,1% das klarzellige Nierenzellkarzinom, gefolgt von den papillären Nierenzellkarzinomen mit 15,9% und den chromophoben Nierenzellkarzinomen mit 7,1%. Die renalen Onkozytome waren in 4,8% der Fälle in der Studienpopulation vertreten.

Die in der weiteren Arbeit untersuchten chromophoben Nierenzellkarzinome und renalen Onkozytome wurden bei insgesamt 112 Patienten gefunden, dabei handelte es sich um 39 männliche und 28 weibliche Patienten mit chromophoben Nierenzellkarzinom und 27 männliche und 18 weibliche Patienten mit renalem Onkozytom. Dies entsprach bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen 4,1% Männer und 3,0% Frauen der gesamten Studienpopulation. Im Falle der Onkozytome fanden sich folgende Werte: 2,9% Männer und 1,9% Frauen bezogen auf die gesamte Studienpopulation.

keiten der TNM-Klassifikation der analysierten Nierenzellkarzinomen der Studienpopulation.
logische Graduierung nach Fuhrmann angegeben. n.b.: nicht bekannt

Tumorentität	T										N				M				R				Grad Fuhrmann						
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	3c	4	5	Gesamt	0	1	2	n.b.	Gesamt	0	1	2	n.b.	Gesamt	0	1	2	3	4	n.b.	Gesamt		
Chromophobes Nierenzellkarzinom	21	13	6	4	17	2	1	0	3	67	40	1	0	26	45	6	16	67	62	2	3	0	31	33	3	0	67		
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	238	140	26	2	118	75	3	9	25	613	320	33	7	253	439	85	89	613	567	27	19	96	363	105	48	1	613		
Nierenzellkarzinom ohne nähere Angaben	0	3	1	0	4	3	0	0	0	11	4	2	1	4	5	1	5	11	9	1	1	0	4	4	2	1	11		
Onkozytom	5	1	0	0	0	0	0	0	3	45	11	1	0	33	6	0	39	45	41	0	4	0	37	3	0	5	45		
Papilläres Nierenzellkarzinom	67	41	8	9	17	7	1	0	0	150	43	6	5	96	105	11	34	150	145	4	1	2	99	48	1	0	150		
Sarkomatoides Nierenzellkarzinom	2	5	2	1	21	7	0	13	0	51	22	5	6	18	21	23	7	51	35	14	2	0	2	12	37	0	51		
Tubulopapilläres Nierenzellkarzinom	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1		
Urothelkarzinom	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3	1	1	0	1	1	0	2	3	2	1	0	0	1	2	0	0	3		
Unbekannt	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1		
Gesamt	335	203	43	16	180	94	5	22	44	942	441	49	19	433	623	127	192	942	863	49	30	98	537	208	92	7	942		

Aus Tabelle 8 wird ersichtlich, dass bis auf die sarkomatoiden Nierenzellkarzinome die pT-Kategorie pT1a die Häufigste darstellte. Die sarkomatoiden Nierenzellkarzinomen wurden überwiegend in der pT-Kategorie pT3a diagnostiziert. Dies entspricht einem 41%igen Anteil der sarkomatoiden Nierenzellkarzinome. Die in der Arbeit detaillierten analysierten chromophoben Nierenzellkarzinome und Onkozytome traten am häufigsten als pT1a auf. Dabei muss einschränkend festgehalten werden, dass bei im Falle der renalen Onkozytome die pT-Kategorie von 39 Patienten (87%) nicht bekannt war. Interessanterweise waren die prozentualen Häufigkeiten bei den chromophoben und klarzelligen Nierenzellkarzinomen vergleichbar. In den T-Kategorien T1a und T1b der chromophoben Nierenzellkarzinome fanden sich 33 bzw. 20% der Patienten, wohingegen die klarzelligen Nierenzellkarzinome bei 39 bzw. 23% in den oben genannten Stadien zu finden war. Eine weitere Häufung konnte für das chromophobe (27%), das klarzellige (19%) und das sarkomatoide (41%) Nierenzellkarzinom in der pT-Kategorie pT3a beobachtet werden.

Für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen (N) waren die Daten nur von 441 Patienten (54%) bekannt. Der häufigste Lymphknotenstatus war N0 (kein Lymphknotenbefall), das entspricht einem prozentualen Anteil von 87% aller analysierten Tumoren.

Bezüglich der Metastasierung zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis. Den häufigsten Metastasierungsstatus stellte das Nichtvorhandensein von Metastasen beim chromophoben (88%), klarzelligen (84%) und papillären (91%) Nierenzellkarzinom und Onkozytom (100%) dar (M0). Auffällig ist die M1-Metastasierung in 52% der Fälle beim sarkomatoiden Nierenzellkarzinom. Die Daten waren in 750 Fällen (80%) bekannt. Für den Resektionsstatus konnte festgestellt werden, dass bei den meisten operativen Eingriffen kein Tumorgewebe im mikroskopisch gesunden Resektionsrand nachgewiesen werden konnte (R0). Von 97% der Fälle war der Resektionsstatus bekannt. Für die sarkomatoiden Nierenzellkarzinome wurde die höchste R1-Resektionsrate von 29% beobachtet. Bei Betrachtung der Fuhrmanngraduierung fällt auf, dass sich die meisten untersuchten Fälle im Grad 2 befanden (57%).

3.2 Histochemische und immunhistochemische Analyse

Die histochemische Reevaluation der angefertigten TMAs erfolgte zum Zwecke der Tumortypisierung sowie zur Bestimmung der Fuhrmann-Graduierung. In vier Fällen (0,4%) kam es zu einer Neubewertung der Tumorentität. Die entsprechenden Fuhrmann-Graduierungen für die jeweiligen Tumorentitäten sind in Tabelle 8 aufgeführt. In Abbildung 4 ist eine repräsentative, histochemische Anfärbung mittels H&E-Färbung für ein klarzelliges Nierenzellkarzinom gezeigt.

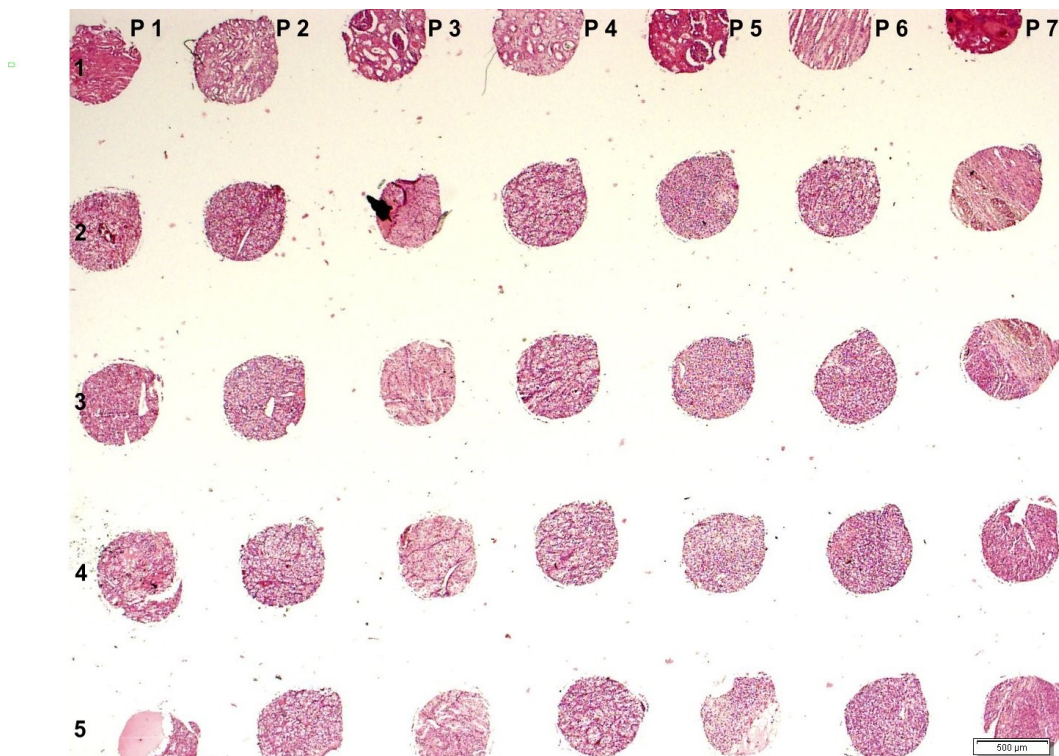


Abbildung 4: Repräsentative H&E-Färbung eines TMA von klarzelligen Nierenzellkarzinomen von 7 Patienten. Jede dargestellte Spalte zeigt die Gewebssproben von jeweils einem Patienten (P1 bis P7). Dabei stellt die oberste Reihe (1) eine mikroskopische und makroskopische nicht pathologisch beurteilte Gewebssprobe dar. Die übrigen vier Reihen (2 bis 5) sind Tumorgewebssproben der jeweiligen Patienten. 20-fache Vergrößerung.

Die Abbildung 5 zeigt repräsentative H&E-Färbungen verschiedener in dieser Studie analysierten Nierentumoren. Für das am häufigsten diagnostizierte klarzellige Nierenzellkarzinom konnte das typische pflanzenzellartige Aussehen der Tumorzellen mit dem namensgebenden klaren Erscheinungsbild des Zytoplasmas nachgewiesen werden. Die Tumorzellen haben im Falle des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ihren Ursprung hauptsächlich im proximalen Tubulus. Für die zweithäufigste diagnostizierte Tumorentität, dem papillären Nierenzellkarzinom, waren die typischen papillären und tubulären Strukturen

der Tumorzellen mit eosinophiler Färbung, die ihren Ursprung im proximalen Tubulus haben, sichtbar. Das chromophobe Nierenzellkarzinom (dritthäufigste Entität) zeigte die typische farblose, feinretikuläre Zytoplasmastruktur der Tumorzellen, die ihren Ursprung im Sammelrohr haben. Für die renalen Onkozytome (seltenste Entität) konnte das nestartige Auftreten der Tumorzellen, die ihren Ursprung im Sammelrohr haben, gezeigt werden.

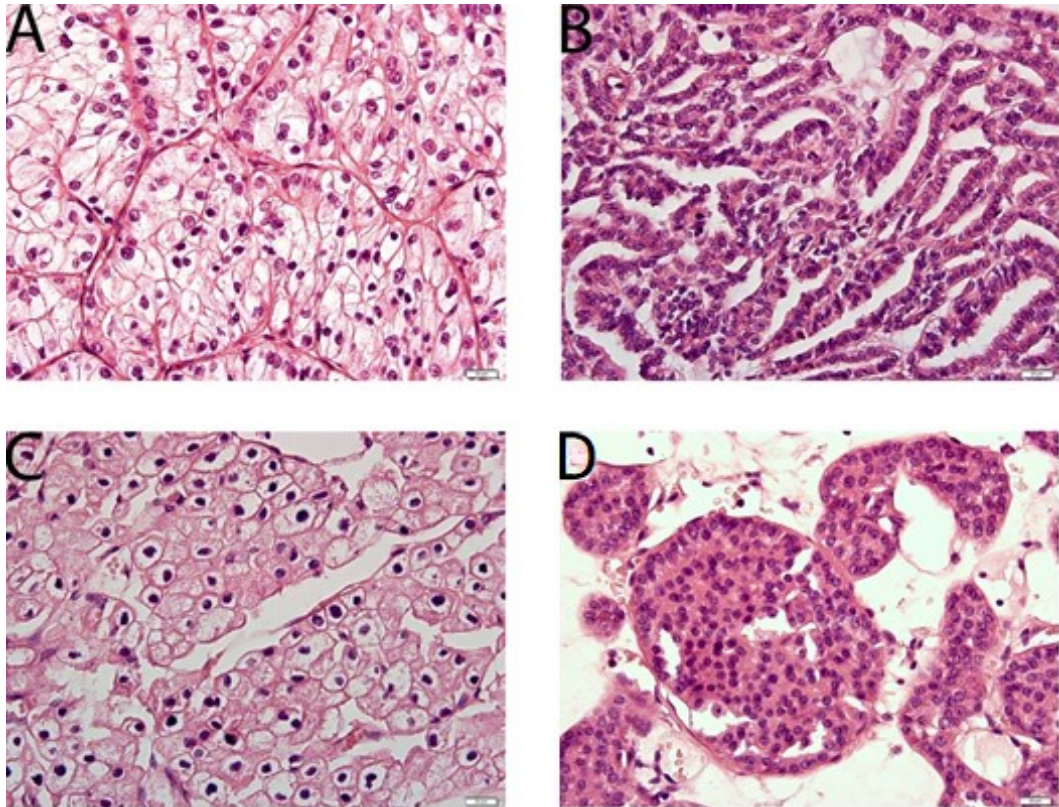


Abbildung 5: Repräsentative histochemische H&E-Färbung verschiedener, in der vorliegenden Studie analysierten Nierenzelltumoren: A klarzelliges Nierenzellkarzinom, B papilläres Nierenzellkarzinom, C chromophobes Nierenzellkarzinom, D Onkozytom, 400-fache Vergrößerung

Die immunhistochemische Analyse von c-Kit (CD 117) ist in Abbildung 6 repräsentativ gezeigt. Im Falle des nicht pathologischen Nierengewebes wurde die c-Kit-Expression mit einer starken Anfärbung der Plasmamembranen der Zellen des distalen Tubulussystems und der Sammelrohre dargestellt. Im Gegensatz dazu zeigt sich beim chromophoben Nierenzellkarzinom eine zytoplasmatische sowie eine membranäre Lokalisation von c-Kit. Die untersuchten renalen Onkozytome zeigen ein vergleichbares Expressionsverhalten (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: c-kit-Expression und Gesamt-c-kit-Score bei verschiedenen Entitäten der Nierentumoren. In insgesamt 10 Fällen konnte aus methodischen Gründen keine Zuordnung der c-kit-Expression und des Gesamt-c-kit-Scores erfolgen. chRCC: chromophobes Nierenzellkarzinom, ccRCC: klarzelliges Nierenzellkarzinom, RCC o. n. A.: Nierenzellkarzinom ohne nähere Angaben, RO: renales Onkozytom, ppRCC: papilläres Nierenzellkarzinom, scRCC: sarkomatoides Nierenzellkarzinom, tpRCC: tubulopapilläres Nierenzellkarzinom, UC: Urothelkarzinom

	c-kit-Expression				Gesamt-c-kit-Score							
	c-kit negativ		c-kit positiv		kein		schwach		moderat		stark	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
chRCC	13 / 67	19	54 / 67	81	13 / 67	19	20 / 67	30	26 / 67	39	8 / 67	12
ccRCC	600 / 613	98	6 / 613	1	600 / 613	98	3 / 613	0,5	1 / 613	0,2	2 / 613	0,3
RCC o.n.A.	10 / 11	91	1 / 11	9	10 / 11	91	1 / 11	9	0 / 11	0	0 / 11	0
RO	8 / 44	18	36 / 44	82	8 / 44	18	22 / 44	50	10 / 44	23	4 / 44	9
ppRCC	146 / 151	97	4 / 151	3	146 / 151	97	2 / 151	1,3	2 / 151	1,3	0 / 151	0
scRCC	51 / 51	100	0 / 51	0	51 / 51	100	0 / 51	0	0 / 51	0	0 / 51	0
tpRCC	1 / 1	100	0 / 1	0	1 / 1	100	0 / 1	0	0 / 1	0	0 / 1	0
UC	1 / 3	33	0 / 3	0	1 / 3	33	0 / 3	0	0 / 3	0	0 / 3	0
unbekannt	3 / 4	75	1 / 4	25	3 / 4	75	1 / 4	25	0 / 4	0	0 / 4	0
Gesamt	833 / 945	88	102 / 945	11	833 / 945	88	49 / 945	5,2	39 / 945	4,1	14 / 945	1,5

Hinsichtlich des c-kit-Expressionsscores und der pT-, pN- und cM-Stadien konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

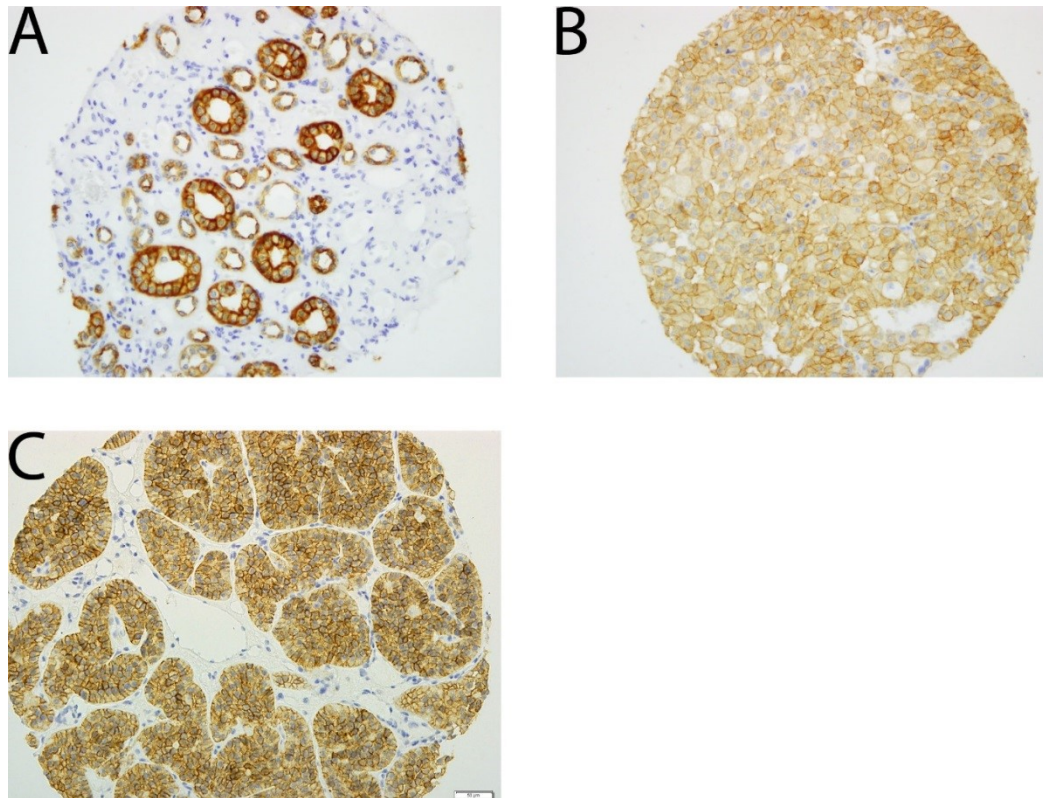


Abbildung 6: Repräsentativer immunhistochemischer Nachweis von CD 117 (c-kit) in nicht pathologischem Nierengewebe (A), chromophoben Nierenzellkarzinom (B) und Onkozytom (C). Zur Visualisierung wurde der Farbstoff DAB verwendet (braune Färbung). Im nicht pathologischen Nierengewebe zeigt sich ein positives Anfärbeverhalten in den Plasmamembranen der Zellen des distalen Tubulussystems und der Sammelrohre. Im Gegensatz dazu zeigt sich im chromophoben Nierenzellkarzinom (B) ein positiver c-kit-Nachweis sowohl in den Plasmamembranen als auch im Zytoplasma der Tumorzellen. Ein vergleichbares Anfärbeverhalten zeigte sich bei den Onkozytomen (C). 200-fache Vergrößerung.

Der quantitative Vergleich zwischen der c-kit-Expression mittels des c-kit-Scores zwischen nicht pathologischem und pathologischem Nierengewebe (chromophobe Nierenzellkarzinome und Onkozytome) zeigte, dass es eine deutlich (9,5-fache) höhere, statistisch signifikante c-kit-Expression im pathologischen Nierengewebe gibt ($p < 0,001$; Wilcoxon Signed Rank Test; siehe Abbildung 7). Der durchschnittliche c-kit-Score des nicht pathologischen Nierengewebes lag bei $0,63 \pm 0,8$, während der Mittelwert des c-kit-Scores für das pathologische Nierengewebe bei $6,0 \pm 3,8$ lag.

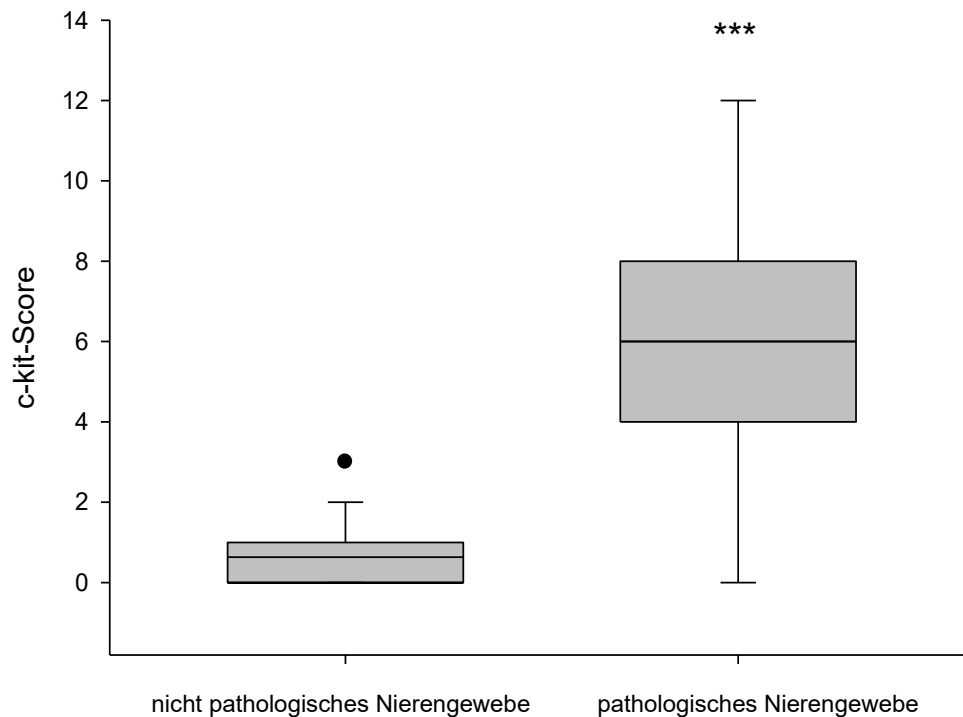


Abbildung 7: Box und Whisker-Graphik des c-kit-Scores von nicht pathologischem Nierengewebe und pathologischem Nierengewebe (chromophobe Nierenzellkarzinome und Onkozytome). Die Daten des nicht pathologischen Nierengewebes stammen von den Kontrollstanzen der TMAs, die mit c-kit angefärbt wurden. Dabei handelt es sich um mikroskopisch nicht pathologisch bewertetes Gewebe. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter 9,5-facher Unterschied zwischen der c-kit-Expression zwischen nicht pathologischem und pathologischem Nierengewebe (** $p < 0,001$; Wilcoxon Signed Rank Test).

3.3 c-kit-Mutationsanalyse

Für die c-kit-Mutationsanalysen wurden 2 Onkozytome und 21 chromophobe Nierenzellkarzinome ausgewählt, die mindestens eine moderate bzw. eine starke c-kit-Färbung (kit-Score) aufwiesen (siehe Tabelle 10). Es zeigte sich, dass für alle analysierten Genloci keine Mutation bzw. Polymorphismus nachgewiesen werden konnte. Somit wiesen alle analysierten Tumor-DNA-Proben die Wildtyp-Variante in den untersuchten Exons für das c-kit-Gen auf. In einem Fall konnte keine Mutationsanalyse vorgenommen werden, da die Qualität der extrahierten DNA nicht für eine Mutationsanalyse ausreichte. Es konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen Mutationsstatus und Expressions-Score von c-kit in chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Ergebnisse der c-kit-Mutationsanalyse und des kit-Scores von 2 Onkozytomen und 21 chromophoben Nierenzellkarzinomen. RO: renales Onkozytom, chRCC: chromophobes Nierenzellkarzinom, n.d.: nicht detektierbar, wt: Wildtyp

Fallnummer	Diagnose	kit-Score	Exon 9	Exon 11	Exon 13	Exon 14	Exon 15	Exon 17
448	RO	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
450	RO	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
481	chRCC	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
483	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
484	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
487	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
489	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	n.d.	wt
497	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
610	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
613	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
604	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
430	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
441	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
442	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
443	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
444	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
446	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
459	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
469	chRCC	12	wt	wt	wt	wt	wt	wt
560	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
594	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
746	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt
779	chRCC	8	wt	wt	wt	wt	wt	wt

4. Diskussion

4.1 Studienpopulation

Die Häufigkeiten der in der vorliegenden Studie analysierten Tumorentitäten an humanen Nierenzellkarzinomen entspricht den in der Literatur bekannten Häufigkeiten (Haferkamp et al., 2006). Das klarzellige Nierenzellkarzinom stellt mit 70-80% die häufigste maligne Tumorentität der humanen Nierentumoren dar. Das Auftreten von 65,1% dieser Tumorentität in der vorliegenden Studienpopulation bestätigt diese Tatsache. Der zweithäufigste maligne Tumor der Niere, das papilläre Nierenzellkarzinom, wird in der Literatur mit einer Häufigkeit von 10 bis 20% aller Nierentumoren beschrieben. Die in der vorliegenden Studie gefundenen 15,9% an papillären Nierenzellkarzinomen ist in sehr guter Übereinstimmung mit den bekannten Literaturdaten (Haferkamp et al., 2006). Das chromophobe Nierenzellkarzinom stellte mit 7,1% die dritthäufigste Tumorentität der vorliegenden Studienpopulation dar, was der bekannten Prävalenz von 5% entspricht (Haferkamp et al., 2006). Die Onkozytome traten mit Häufigkeit von 4,8% in der vorliegenden Studie auf. Dies ist in relativ guter Übereinstimmung mit den bekannten Häufigkeiten aus der Literatur. In Abhängigkeit von Klassifikationssystem werden Häufigkeiten zwischen 2 und 5% angegeben (Brinkmann et al., 2001). Die Klassifikation nach Kovacs sowie deren Modifikation von Weiss et al. (Kovacs, 1993; Weiss et al., 1995) beschreibt eine Häufigkeit der Onkozytome von 2%, wohingegen die Heidelberg-Klassifikation (Kovacs et al., 1997) eine Häufigkeit von 3 bis 5% angibt und die in Deutschland am häufigsten verwendete Klassifikation der Nierenzellkarzinome nach Thoenes et al (Thoenes et al., 1991; Thoenes et al., 1986) ein 5%iges Auftreten beschreibt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass humane Nierenzellkarzinome gehäuft beim männlichen Geschlecht auftreten (Kates et al., 2013; Siegel et al., 2012). Diese Beobachtung konnte für alle untersuchten Tumorentitäten in der vorliegenden Studienpopulation bestätigt werden (siehe Tabelle 7). Dieser Geschlechtsunterschied trat ebenfalls bei den benignen Onkozytomen in der uns analysierten Studienpopulation auf. Dies bestätigt die statistischen Auswertungen in der Literatur (Mauermann et al., 2013), in welchen ein gehäuftes Auftreten von Onkozytomen beim männlichen Geschlecht nachgewiesen wurden. Die in der Literatur publizierten Daten stehen dabei in perfekter Übereinstimmung (Männer: 62%, Frauen: 38%, (Mauermann et al., 2013) mit unseren Studienergebnissen.

Dabei stellt das renale Onkozytom innerhalb der benignen Nierentumoren eine Ausnahme dar, da andere benigne Nierentumoren wie z.B. das Angiomyolipom häufiger bei Frauen auftreten.

Bezüglich des Alters zum Operationszeitpunkt kann festgehalten werden, dass es keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern gab (Männer: 62 Jahre, Frauen: 65 Jahre, Angabe als Median). Das Alter ist als Risikofaktor für Tumoren im Urogenitaltrakt des Menschen bereits identifiziert worden (Macleod et al., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass der Erkrankungsgipfel für humane Nierentumoren in der Altersklasse 60 bis 64 Jahre mit 26% aller Erkrankten liegt. Dies stimmt mit den Altersdaten zum Operationszeitpunkt unserer Studie überein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es sich aus epidemiologischer Sicht bei der untersuchten Studienpopulation um eine repräsentative Patientengruppe hinsichtlich humaner Nierentumoren handelt. Somit können die weiteren Analysen ebenfalls als repräsentativ angesehen werden.

4.2 Epidemiologie der TNM-Klassifikation

Hinsichtlich der pT-Kategorie (TNM-Klassifikation) wurde die untersuchte Studienpopulation mit der Arbeit von Qi et al. verglichen (Qi et al., 2014). Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der prozentualen Häufigkeiten der verschiedenen pT-Kategorien (pT1 bis pT4). Die häufigste pT-Kategorie in unserer Population war mit 37% die pT1a. Dies lässt sich vergleichen mit den Angaben aus der oben genannten Publikation mit den Amerikanern nicht afrikanischer Herkunft (pT1a: 42,7%). Die zweithäufigste pT-Kategorie in unserer Studie war pT1b mit 23%. Das stimmt mit der in der Vergleichspopulation (Amerikaner nicht afrikanischer Herkunft) gefundenen zweithäufigsten pT-Kategorie pT1b (20,8%) gut überein. Für die pT-Kategorien pT3a-c zeigten sich interessanterweise, dass die Gesamtprozentzahl der Vergleichsstudie bei 20,7% lag, während in der vorliegenden Studienpopulation bereits die pT-Kategorie pT3a bei 20% aller Tumorentitäten repräsentiert war. Dies lässt sich mit Tatsache erklären, dass in unserer Studienpopulation die meisten Patienten mit pT-Kategorie pT3 als pT3a charakterisiert wurden. Es zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit der Metastasierung von der Tumorgroße und -ausbreitung (siehe Tabelle 7; $p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test), wobei die pT-Kategorie pT3a die meisten nicht metastasierten Fälle an Patienten aufwies. Diese Patienten wurden einer operativen Therapie zugeführt und somit in die vorliegende Studie eingeschlossen. Dies stellt den Grund für den hohen Anteil an Kategorie pT3a in unserer Population dar.

In Bezug auf die Metastasierung präsentiert die Vergleichsstudie (Qi et al., 2014) nur Daten zum klarzelligen, papillären und sogenannten anderen humanen Nierenzellkarzinomen. Der

Vergleich mit den klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigt einen deutlichen Unterschied in der Metastasierung. Während in der Vergleichsstudie 84,3% der klarzelligen Nierenzellkarzinome bei Amerikanern nicht afrikanischer Herkunft metastasiert waren, zeigte sich in unserer Studienpopulation eine Metastasierungsrate von 16%. Dies lässt sich bereits mit den oben genannten Gründen der operativen Versorgung bei metastasierten Nierenzellkarzinomen erklären, denn es wurden nur Patienten einer operativen Therapie zugeführt, die keine Fernmetastasierung aufwiesen. Die Operation in Form einer Nephrektomie (radikal oder partiell) war notwendig um die Gewebeproben für die vorliegende Studie zu gewinnen und somit konnten auch nur diese Fälle analysiert werden.

4.3 c-kit Expression und histologische Graduierung nach Fuhrmann

Die Expression von c-Kit in nicht pathologischem und pathologischem humanen Nierengewebe wurde in der Vergangenheit bereits charakterisiert und beschrieben (Huo et al., 2005; Kato et al., 2005). Im nicht neoplastischen Nierengewebe ist c-kit in Membranen und im Zytoplasma (50% der Zellen) der Zellen des Sammelrohrsystems lokalisiert. Diese Lokalisation konnte in unseren eigenen Untersuchungen bestätigt werden, da im nicht neoplastischen Nierengewebe eine schwache c-kit-Färbung in den Zellen des distalen Tubulus- und des Sammelrohrsystems nachweisbar war. Hinsichtlich der Expression von c-kit in chromophoben Nierenzellkarzinomen ist festzuhalten, dass in unserer Studie 81% positiv waren. Dies deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit der c-kit-Expression bei chromophoben Nierenzellkarzinomen (Bereich zwischen 46 und 100%), (Huo et al., 2005; Miliaras et al., 2004; Pan et al., 2004; Petit et al., 2004; Went et al., 2004; Yamazaki et al., 2003). Dabei findet sich ein diffuses Expressionsmuster von c-kit beim chromophoben Nierenzellkarzinom, was durch eine membranständige und auch zytoplasmatische Färbung des Proteins charakterisiert ist. Ähnliche Aussagen lassen sich beim renalen Onkozytom treffen. In den von uns analysierten Onkozytomen ließ sich in 82% der Fälle eine c-kit-Expression nachweisen. Die Literaturangaben geben diesbezüglich einen Bereich von 71 bis 100% an (Huo et al., 2005; Miliaras et al., 2004; Pan et al., 2004; Petit et al., 2004; Went et al., 2004; Yamazaki et al., 2003). Bei den von uns analysierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigte sich im Gegensatz dazu eine c-kit-Expressionshäufigkeit von lediglich 1%. Solch geringe c-kit-Expressionshäufigkeiten für das

klarzellige Nierenzellkarzinom sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Huo et al., 2005).

Interessanterweise zeigte der intraindividuelle Vergleich der c-Kit-Expressionen zwischen nicht pathologischem und pathologischem Nierengewebe eine deutlich signifikant höhere Expression von c-Kit in den chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen. Dieser quantitative Unterschied wurde in der Literatur bisher zu unserem besten Wissen noch nicht beschrieben. Es wurde jedoch schon semiquantitativ beschrieben, dass c-kit im normalen Nierengewebe eine niedrigere Expression zeigt im Vergleich zu chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen (Kato et al., 2005). Im Gegensatz dazu beschrieben Horstmann et al. (Horstmann et al., 2012) eine höhere c-kit-Expression im normalen Nierengewebe im Vergleich zu verschiedenen Nierenzelltumorentitäten. Diese Unterschiede zu unserer Arbeit können folgendermaßen erklärt werden: in der vorliegenden Arbeit wurde ein intraindividueller Vergleich der c-kit-Expression zwischen nicht pathologischem Nierengewebe und chromophoben Nierenzellkarzinom / Onkozytom durchgeführt, während in der Arbeit von Horstmann et al. kein intraindividueller Vergleich vorgenommen wurde. Vielmehr wurde für die Analyse von den Tumoren unabhängige Referenzproben (normales Nierengewebe) verwendet. Weiterhin ist auffällig, dass in dieser Arbeit c-kit auch im proximalen Tubulus nachgewiesen werden konnte (100%). Obwohl diese Färbung ausschließlich zytoplasmatisch war, sind solche Befunde in der Literatur bisher nicht weiter beschrieben worden.

Die Auswertung der Graduierung nach Fuhrmann ergab, dass der Fuhrmanngrad 2 am häufigsten in unserer Studienpopulation diagnostiziert wurde. Es zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Fuhrmanngrad sowie dem TNM-Stadium. Die häufige Diagnostik des Fuhrmanngrades 2 in unserer Studienpopulation kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann dies beispielsweise durch die selektive Auswahl von Patienten, die operiert wurden zustande kommen, zu anderen kann es durch lokale Unterschiede der Differenzierung innerhalb der Gewebeschnitte bedingt sein.

4.4 Mutationsanalyse

In der vorliegenden Studie wurden 21 chromophobe Nierenzellkarzinome und 2 renale Onkozytome auf bereits gut charakterisierte Mutationen (Zimpfer et al., 2014) des c-kit-Gens (KIT) untersucht (siehe Tabelle 10). Es zeigte sich, dass alle untersuchten Exons des KIT als Wildtyp vorlagen. Somit konnte keine Analyse hinsichtlich der Expressionsstärke des c-kit-Proteins bezüglich Mutationen im KIT vorgenommen werden.

Es kann festgehalten werden, dass bisher keine expressionsaktivierenden KIT-Mutationen in chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen gefunden wurden (Kato et al., 2005; Krüger et al., 2005; Pan et al., 2004; Yamazaki et al., 2003). Beispielsweise wurde in einer Studie (Kato et al., 2005) für 5 chromophobe Nierenzellkarzinome und 5 Onkozytome keine Mutationen in den Exonen 9, 11, 13 und 17 des KIT gefunden. Entsprechende Ergebnisse hinsichtlich von Mutationen im Kit-Gen in chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen wurden in weiteren Arbeiten (Kato et al., 2005; Krüger et al., 2005; Pan et al., 2004; Yamazaki et al., 2003) einschließlich der vorliegenden Studie bestätigt.

4.5 c-Kit-Expression und Tyrosinkinase-Inhibitoren beim humanen Nierenzellkarzinom

Das c-kit-Expressionsverhalten in malignen Tumoren ist deshalb von Interesse, da c-kit ein Angriffspunkt des Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) Imatinib (Glivec®) darstellt. Dies ist ein bereits für die Behandlung c-Kit-(CD 117)-positiver nicht resezierbarer und/oder metastasierter maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) bei Erwachsenen ein sehr gut bewährtes Therapieprinzip (Novartis, 2015a). Imatinib gehört in die First-Line-Therapie dieser Tumorerkrankungen. Im Weiteren ist bekannt, dass Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Sorafenib (Nexavar®), Sunitinib (Sutent®) und Pazopanib (Votrient®) zur Therapie beim metastasierten / fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom von erwachsenen Patienten zugelassen sind (Novartis, 2015b). Ein Grund für die nachgewiesene Wirksamkeit liegt möglicherweise in der bereits bekannten und in dieser Arbeit ebenfalls bestätigten Überexpression (gegenüber normalen Nierengewebe) von c-kit in chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen. Interessanterweise gibt es jedoch keinen Unterschied zwischen nicht-klarzelligen und klarzelligen Nierenzellkarzinomen in den Ansprechraten dieser Karzinome gegenüber den obengenannten TKIs (Stadler et al., 2007). Dies erscheint insofern überraschend, da in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass die c-

kit-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu den chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen deutlich geringer ist. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in den durchgeführten Studien beim Hauptanteil der Patienten ein klarzelliges Nierenzellkarzinom diagnostiziert worden war (Bellmunt et al., 2013; Gore et al., 2009; Heng et al., 2009; Kroeger et al., 2013). In einer Subgruppenanalyse konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten mit einem chromophoben Nierenzellkarzinom ein besseres Gesamtüberleben hatten als Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (Kroeger et al., 2013). Dies unterstreicht die Wirksamkeit der TKIs und der Bedeutung von c-kit bei der Behandlung der Patienten mit chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen. Jedoch sind weitere Studien nötig um molekulare Marker zu bestimmen, die ein optimales Ansprechen auf die TKIs erklären bzw. vorhersagen. Zusammenfassend muss jedoch festgehalten werden, dass der pathogenetische Mechanismus von c-kit für die chromophoben Nierenzellkarzinome und Onkozytome nicht komplett aufgeklärt wurde bzw. teilweise unklar bleibt. Dies unterstreicht die bereits erwähnte Notwendigkeit für weitere in-vitro und in-vivo Studien um die Ansprechrate von TKIs bei der Behandlung von chromophoben Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen zu optimieren.

5. Zusammenfassung

Die Therapie des humanen Nierenzellkarzinoms hat sich in den letzten Jahren durch den Einsatz sogenannter „Targeted-Therapy“ deutlich verändert. Zu diesen Substanzen gehören u.a. Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. Sunitinib und Pazopanib. Es handelt sich dabei um Multikinase-Inhibitoren, die u.a. auch den Stammzellfaktor-Rezeptor c-Kit inhibieren.

Hinsichtlich der Expression von c-Kit bei humanen Nierenzellkarzinomen ist bekannt, dass das chromophobe Nierenzellkarzinom im Vergleich zum klarzelligen Nierenzellkarzinom durch eine deutliche Überexpression charakterisiert ist. Aus der Literatur sind bereits Mutationen bekannt, die die Aktivität und Expression von c-Kit beeinflussen können. Aufgrund des lückenhaften Kenntnisstandes bezüglich des Zusammenhanges von Mutationen im Kit-Gen und der Expression von c-Kit im chromophoben Nierenzellkarzinom wurde dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Zunächst wurde die vorliegende Studienpopulation hinsichtlich ihrer Epidemiologie und TNM-Stadien mit Literaturdaten verglichen. Dabei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung mit unserer Studienpopulation. Dann wurden aus 948 Patienten die chromophoben Nierenzellkarzinome identifiziert und entsprechend auf c-Kit-Mutation immunhistochemisch analysiert. Hierbei zeigte der intraindividuelle Vergleich von nicht pathologischem Nierengewebe mit dem pathologischen Nierengewebe von chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen, dass das pathologisch veränderte Nierengewebe (chRCC und RO) eine signifikant höhere Expression von c-Kit zeigte. Des Weiteren wurde die Tumor-DNA auf Mutationen im Kit-Gen untersucht. Dabei konnte in der vorliegenden Studie keine aktivierende Kit-Mutation nachgewiesen werden. Es konnten nur Wildtyp-Allele für die untersuchten Exons gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von c-Kit in chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen nicht von Mutationen in den typischen Exons des Kit-Gens verursacht wird. Dennoch könnte c-Kit ein diagnostischer und prognostischer Faktor bei der Therapie des chromophoben Nierenzellkarzinoms und renalen Onkozytomen werden.

V. Literaturverzeichnis

- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* **11**(2): 155-168.
- Amann K, Kain R, Klöppel G (2015). *Pathologie - Urogenitale und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett*. edn. Springer Verlag GmbH.
- Bellmunt J, Dutcher J (2013). Targeted therapies and the treatment of non-clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **24**(7): 1730-1740.
- Bergmann L, Bauernhofer T, Bokemeyer C, Casper J, Gailer T, Grünwald V, Kirchner HH, Kuczyk MA, Overkamp F, Peters I, Schmidinger M, Stenner-Liewen F (2018). Onkopedia: Nierenzellkarzinom (Hypernephrom). doi: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/nierenzellkarzinom-hypernephrom/@@view/html/index.html#IDOEWQAE>
- Brinkmann OA, Hertle L (2001). Molekulargenetik des Nierenzellkarzinoms und Tumormarker. *Der Onkologe* **7**(7): 715-721.
- Brkovic D, Jakse G (2001). [Therapy of ureteral tumor]. *Urologe A* **40**(6): 456-459.
- Choudhary S, Rajesh A, Mayer NJ, Mulcahy KA, Haroon A (2009). Renal oncocytoma: CT features cannot reliably distinguish oncocytoma from other renal neoplasms. *Clin Radiol* **64**(5): 517-522.
- Escudier B (2007). Sorafenib [corrected] in kidney cancer. *Ann Oncol* **18 Suppl 9**: ix90-93.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* **6**(7): 655-663.
- Godley PA, Taylor M (2001). Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* **13**: 199-203.
- Gore ME, Szczylik C, Porta C, Bracarda S, Bjarnason GA, Oudard S, Hariharan S, Lee SH, Haanen J, Castellano D, Vrdoljak E, Schoffski P, Mainwaring P, Nieto A, Yuan J, Bukowski R (2009). Safety and efficacy of sunitinib for metastatic renal-cell carcinoma: an expanded-access trial. *Lancet Oncol* **10**(8): 757-763.
- Haferkamp A, Rohde D, Müller SC, Rubben H, Hohenfellner M (2006). [Renal cell carcinoma]. *Urologe A* **45 Suppl 4**: 74-84.
- Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S, Venner P, Knox JJ, Chi KN, Kollmannsberger C, McDermott DF, Oh WK, Atkins MB, Bukowski RM, Rini BI, Choueiri TK (2009). Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial

- growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol* **27**(34): 5794-5799.
- Horstmann M, Hennenlotter J, Geiger LM, Vogel U, Schmid H, Kuehs U, Stenzl A, Bedke J (2012). Evaluation of the KIT/stem cell factor axis in renal tumours. *Anticancer Res* **32**(10): 4339-4345.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ, Global AT (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**(22): 2271-2281.
- Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS, Patton KT, Gupta R, Popov B, Laskin WB, Yeldandi A, Teh BT, Yang XJ (2005). C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol* **36**(3): 262-268.
- Jonasch E, Gao J, Kimryn RW (2014). Renal cell carcinoma. *BMJ* 349: g4797. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.g4797>.
- Kaatsch R, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kriehoff-Henning E, Kunz B, Penzkofer A, Tremel K, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010, pp 96-99: Robert Koch-Institut.
- Kanayama HO, Fukumori T, Fujimoto H, Nakanishi H, Ohyama C, Suzuki K, Nishiyama H, Eto M, Miki T, Kamoi K, Kubota Y, Takahashi S, Homma Y, Naito S (2015). Clinicopathological characteristics and oncological outcomes in patients with renal cell carcinoma registered in 2007: The first large-scale multicenter study from the Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. *Int J Urol* **22**(9): S1-7.
- Kates M, Whalen MJ, Badalato GM, McKiernan JM (2013). The effect of race and gender on the surgical management of the small renal mass. *Urol Oncol* **31**(8): 1794-1799.
- Kato N, Honma K, Hojo H, Sasou S, Matsuzaki O, Motoyama T (2005). KIT expression in normal and neoplastic renal tissues: immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Pathol Int* **55**(8): 479-483.
- Klatte T, Han KR, Said JW, Bohm M, Allhoff EP, Kabbinaar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ (2008). Pathobiology and prognosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **26**(6): 604-609.
- Kovacs G (1993). Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* **62**: 89-124.

- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Storkel S, van den Berg E, Zbar B (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* **183**(2): 131-133.
- Kroeger N, Xie W, Lee JL, Bjarnason GA, Knox JJ, Mackenzie MJ, Wood L, Srinivas S, Vaishamayan UN, Rha SY, Pal SK, Yuasa T, Donskov F, Agarwal N, Kollmannsberger CK, Tan MH, North SA, Rini BI, Choueiri TK, Heng DY (2013). Metastatic non-clear cell renal cell carcinoma treated with targeted therapy agents: characterization of survival outcome and application of the International mRCC Database Consortium criteria. *Cancer* **119**(16): 2999-3006.
- Krüger S, Sotlar K, Kausch I, Horny HP (2005). Expression of KIT (CD117) in renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Oncology* **68**(2-3): 269-275.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017 OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Nierenzellkarzinom.85.0.html>
- Lennartsson J, Ronnstrand L (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* **92**(4): 1619-1649.
- Li G, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J (2005). S100A1 and KIT gene expressions in common subtypes of renal tumours. *Eur J Surg Oncol* **31**(3): 299-303.
- Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z (2006). 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* **49**(5): 798-805.
- Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J, White E (2013). Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *J Urol* **190**(5): 1657-1661.
- Mauermann J, de Martino M, Waldert M, Haitel A, Klingler HC, Remzi M, Klatte T (2013). Gender differences in benign renal masses. *World J Urol* **31**(5): 1051-1057.
- Mc Dermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, Kirkwood JM, Gordon MS, Sosman JA, Einstoff MS, Tretter CP, Urban WJ, Smith JW, Margolin KA, Mier JW, Gollob JA, Dutcher JP, Atkins MB (2005). Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **23**(1): 133-141.
- Miliaras D, Karasavvidou F, Papanikolaou A, Sioutopoulou D (2004). KIT expression in fetal, normal adult, and neoplastic renal tissues. *J Clin Pathol* **57**(5): 463-466.

- Motzer RJ, Hudes GR, Curti BD, McDermott DF, Escudier BJ, Negrier S, Duclos B, Moore L, O'Toole T, Boni JP, Dutcher JP (2007a). Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **25**(25): 3958-3964.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczyluk C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA (2007b). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**(2): 115-124.
- Ng KL, Rajandram R, Morais C, Yap NY, Samaratunga H, Gobe GC, Wood ST (2014). Differentiation of oncocytoma from chromophobe renal cell carcinoma (RCC): can novel molecular biomarkers help solve an old problem? *J Clin Pathol* **67**(2): 97-104.
- Novartis P (2015a). Fachinformation Glivec®.
- Novartis P (2015b). Fachinformation Votrient®.
- Oxley JD, Sullivan J, Mitchelmore A, Gillatt DA (2007). Metastatic renal oncocytoma. *J Clin Pathol* **60**: 720-722.
- Pan CC, Chen PC, Chiang H (2004). Overexpression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol* **121**(6): 878-883.
- Petit A, Castillo M, Santos M, Mellado B, Alcover JB, Mallofre C (2004). KIT expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of KIT expression in different renal cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* **28**(5): 676-678.
- Pfizer PG (2015). Fachinformation Inlyta®.
- Pfizer PG (2018). Fachinformation Torisel®.
- Pomer S, Schubert J, Schmitz-Dröger B, Voges G, Fischer R, Hermanek P, Huber C, Hulan H, Jocham D, Kauffmann G, Müller R-P, Müller-Wiefel H, Sauer H, Störkel S, Wirth M, Richter-Reichhelm M, Schalkhäuser K, Ludwig G, Stockamp K (1998). Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Nierenparenchymkarzinoms. *Urologe A* **37**: 327-341. doi: http://dgu.springer.de/leit/3_98htm.
- Presti J, Moch H, Reuter V, Huynh D, Waldman F (1996). Chromosome 1 and 14 loss in renal oncocytomas. *Genes chromos cancer* **17**: 199-204.
- Qi P, Tsivian M, Abern MR, Passoni NM, McGinley KF, Polascik TJ (2014). Clinicopathological characteristics and outcomes of surgically excised renal masses in African Americans. *Urol Oncol* **32**(5): 555-560.
- Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Ou SS, Archer L, Atkins JN, Picus J, Czaykowski P, Dutcher J, Small EJ (2008). Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* **26**(33): 5422-5428.

- Roberts R, Govender D (2015). Gene of the month: KIT. *J Clin Pathol* **68**(9): 671-674.
- Roche Registration GmbH (2018). Fachinformation Avastin®.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**(5): 283-298.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* **65**(1): 5-29.
- Stadler WM, Figlin RA, Ernstoff MS, Curti K, Pendergrass S, Srinivas V, Canfield C, Weissman M, Poulin-Costello R, Bukowski M (2007). The advanced renal cell carcinoma sorafenib expanded access trial: safety and efficacy in patients with non-clear cell renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **25** A5036 (Abstract).
- Stec R, Grala B, Maczewski M, Bodnar L, Szczylik C (2009). Chromophobe renal cell cancer - review of the literature and potential methods of treating metastatic disease. *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 134.
- Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB (2001). The BT: Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: Gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9754-9759.
- Thoenes W, Storkel S (1991). [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe A* **30**(6): W41-50.
- Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ (1986). Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* **181**(2): 125-143.
- Unger C (2016). Das metastasierte Nierenzellkarzinom. *Arzneimitteltherapie* **34**: 344-348.
- Van den Berg E, Van der Hout AH, Oosterhuis JW, Störkel S, Dijkhuizen T, Dam A, Zweers HM, Mensink HJ, Buy CH, de Jong B (1993). Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. *Int J Cancer* **55**: 223-227.
- Weiss LM, Gelb AB, Medeiros LJ (1995). Adult renal epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* **103**(5): 624-635.
- Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G (2004). Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol* **22**(22): 4514-4522.
- Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, Kanai Y, Ohki M, Hirohashi S (2003). Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene* **22**(6): 847-852.
- Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, White DE, Liewehr DJ, Merino MJ, Rosenberg SA (2003).

- Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol* **21**(16): 3127-3132.
- Yusenko MV (2010). Molecular pathology of chromophobe renal cell carcinoma: a review. *Int J Urol* **17**: 592-600.
- Zippel L (1942). Zur Kenntnis der Oncocyten. *Virchows Arch A Pathol Anat* **308**: 360-382.

VI. Publikation der Daten dieser Arbeit

Zimpfer A, Janke S, Hühns M, Schneider B, Kundt G, Zettl H, Kilic E, Maruschke M, Hakenberg OW, Erbersdobler A (2014). C-kit overexpression is not associated with KIT gene mutations in chromophobe renal cell carcinoma or renal oncocytoma. *Pathol Res Pract* **210**(8): 521-525.

VII. Lebenslauf

Name: Stephanie Wilken, geb. Janke

Geburtsdatum: 22.12.1987

Geburtsort: Rostock

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

08/1994 – 07/1998 Grundschule „Astrid Lindren“, Rostock

08/1998 – 07/2000 „Wilhelm-von-Humboldt“-Gymnasium, Rostock

08/2000 – 06/2007 Gymnasium „Europaschule an der Rostocker Heide“, Rövershagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufstätigkeit

Seit 07/2007 Zeitsoldat bei der Bundeswehr, Sanitätsdienst

07/2007 – 09/2007 Allgemeine Grundausbildung im Sanitätslehrregiment, Straubing

03/2016 – 05/2018 Assistenzärztin im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz,
Weiterbildung Chirurgie, Abteilung XIV

Seit 06/2018 Truppenarztverwendung im Sanitätsversorgungszentrum Munster,
ArztGrp PzTrS Munster

Studium

Seit 10/2007 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock

03/2011 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

12/2015 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktika

07/2008 – 09/2008 Krankenpflegepraktikum, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

02/2009 – 03/2009 Krankenpflegepraktikum, Klinikum Südstadt Rostock

05/2011 – 07/2011 Famulatur Anästhesiologie, Notaufnahme, Intensivstation,
Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

08/2011 – 09/2011 Famulatur Innere Medizin (Gastroenterologie),
Klinikum Südstadt Rostock

02/2012 – 03/2012 Famulatur ambulante Orthopädie, Fachsanitätszentrum Rostock

07/2012 – 08/2012 Famulatur Gynäkologie & Geburtshilfe, Klinikum Südstadt Rostock

08/2012 – 09/2012 Famulatur Orthopädie- / Unfallchirurgie,
Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

08/2013 – 09/2013 Famulatur Allgemeinmedizin, Gemeinschaftspraxis W. Rachold /
H. Wachsmuth Rostock

Wahlfächer

WS 2012 / 2013 Allgemeine und spezielle Psychopathologie

WS 2012 / 2013 Orthopädie

WS 2013 / 2013 Transfusionsmedizin

SS 2013 Notfallmedizin

SS 2013 Kinderheilkunde speziell

Praktisches Jahr

11/2014 – 03/2015 1. Tertial (Wahlfach): Orthopädie, Universitätsklinikum Rostock

03/2015 – 07/2015 2. Tertial (Chirurgie): Orthopädie- / Unfallchirurgie,
Klinikum Südstadt Rostock

07/2015 – 10/2015 3. Tertial (Innere Medizin): Kardiologie, Klinikum Südstadt Rostock

Promotion

Seit 02/2013 Erstellen der vorliegenden Dissertation am Institut für
Pathologie der Universität Rostock

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Arbeit niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. med. Erbersdobler für die Vergabe dieses hochinteressanten Themenkomplexes.

PD Dr. med. Maruschke möchte ich für die Einarbeitung in das Thema herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus hilfreiche Unterstützung und anregende Diskussionen.

Ferner danke ich Frau Dr. med. Zimpfer für ihre Betreuung, den kritischen Diskurs und die Überlassung notwendiger Quellen und Dokumente sowie die Durchsicht meiner Arbeit. Ohne sie wäre eine Einarbeitung in den Themenkomplex nicht möglich gewesen. Ich möchte mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Projektes gewährte, bedanken.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. Hühns und Herrn Dr. phil. nat. Schneider für die Einführung in die molekularbiologischen Untersuchungsverfahren sowie die Unterstützung und die vielen lieben Worten während der Erarbeitung meiner Dissertation. Die vielen kompetenten Ratschläge kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Ich möchte meinen Dank ebenso den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität Rostock aussprechen. In hervorragender Weise wurde mir geholfen Probleme in der Immunhistochemie zu lösen. Auch für die Mithilfe bei der Anfertigung sämtlicher histologischer Präparate möchte ich mich bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt jedoch PD Dr. Gläser, ohne dessen mühevollen Geduld und liebevolles Verständnis in dieser beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, seine kritischen Betrachtungen, seine differenzierten Anmerkungen sowie die mit ihm zweckdienlichen Diskussionen, vor allem aber sein moralischer Beistand und der menschliche Halt, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben. Wegen seiner persönlichen Bindung und Unterstützung gebührt ihm hier mein voller und besonders herauszustellender Dank.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Ehemann, Tony Wilken, für sein grenzenloses Verständnis. Er stand mir während der Anfertigung dieser Dissertation immer unterstützend, motivierend und liebevoll zur Seite.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinen Geschwistern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und mir während dieser schwierigen Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden, Kameraden, Kommilitonen und Bekannten, die mich im Rahmen des Studiums und der Arbeit begleitet und moralisch unterstützt haben.

IX. Erklärung über die selbstständige Abfassung einer medizinischen Dissertation

Hiermit erkläre ich, Stephanie Wilken,

dass ich die vorliegende medizinische Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Personen angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Informationen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Promotionsbüro vorgelegt.

Rostock, den 08.12.2018

Unterschrift

X. Thesen

Die c-Kit-Expression in chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen unterscheidet sich von der Expression im nicht pathologisch veränderten Nierengewebe.

Die c-Kit-Expression in chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen wird durch Mutationen im c-kit-Gen verursacht.

Die c-Kit-Expression lässt sich nach dem c-Kit-Score, der auf dem modifizierten Allred-Score basiert quantifizieren.

Durch Mutation im c-kit-Gen entstehen Therapiemöglichkeiten durch Tyrosinkinaseinhibitoren.